

Aktivierung spezifischer T-Lymphozyten von Patienten
mit akuter myeloischer Leukämie Inversion(16)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt durch Kerstin Ihlow
aus Gießen

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik IV/V
Leiter: Prof. Dr. med. F. Grimminger
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter:

PD Dr. med. G.-A. Banat

Gutachter:

Prof. Dr. med. A. Reiter

Tag der Disputation:

21. April 2010

Inhalt

I	Einleitung	8
1	Akute myeloische Leukämie (AML)	8
1.1	Geschichte	8
1.2	Definition	8
1.3	Epidemiologie.....	8
1.4	Ätiologie	9
1.5	Einteilung	9
1.6	Klinik.....	10
1.7	Diagnostik	10
1.8	Therapie	11
1.9	Prognose.....	12
1.10	Akute myelomonozytäre Leukämie–Myelomonozytärer Typ mit Eosinophilie (M4eo).....	12
2	Das Immunsystem.....	14
2.1	Allgemeines.....	14
2.2	T-Lymphozyten	14
2.3	Antigenpräsentation	16
2.4	Interaktionen von T- Lymphozyten	17
2.5	Zytotoxische Zellen	18
3	Zytokine.....	19
3.1	Definition	19
3.2	IL-2.....	19
4	Tumorimmunologie.....	20
4.1	Allgemeines.....	20
4.2	Tumorescapemechanismen	21
II	Fragestellung	23
III	Material	25
1	Laborgeräte	25
1.1	Brutschrank.....	25
1.2	Durchflusszytometer.....	25
1.3	Mikroskop.....	25
1.4	Pipetten	25
1.5	Pipettierhilfen	25

1.6	Sterile Arbeitsbank	25
1.7	Vortex	25
1.8	Wasserbad	25
1.9	Zentrifuge	25
1.10	Bestrahlungsgerät	25
1.11	PCR-Zubehör	25
1.12	Gelelektrophorese-Zubehör	25
1.13	Oberflächenscanner	26
1.14	Zell-Harvester	26
2	Weitere Materialien	26
2.1	Blutentnahmesysteme	26
2.2	Gewebekulturplatten	26
2.3	Kulturflaschen	26
2.4	Pipettenspitzen	26
2.5	Röhrchen	26
3	Medien	26
3.1	Kulturmedium	26
3.2	Waschmedium	27
3.3	Einfriermedium	27
3.4	IL-2-Medium	27
4	Puffer und Reagenzien	27
4.1	Ficoll, Trennlösung zur Dichtegradientenzentrifugation	27
4.2	Fixationslösung für Durchflusszytometrie	27
4.3	Färbe- und Waschpuffer für Durchflusszytometrie	27
4.4	PBS	27
4.5	Heparin	27
4.6	Propidium-Jodid	27
4.7	Trypanblau-Lösung	28
4.8	BSA	28
4.9	FCS	28
4.10	³ H-Thymidin-Lösung	28
5	Biomagneten	28
5.1	Isolations-Kits	28
5.2	CD3/CD28 T-Zell Expander	29

6	Interleukin 2.....	29
7	PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit	29
8	Antikörper.....	29
9	HLA-A Typisierung	30
10	Westernblot.....	31
10.1	Antikörper.....	31
10.2	Chemilumineszenz Reagenzien.....	31
10.3	Gewichtsstandard.....	31
10.4	Weitere Reagenzien.....	31
11	Zelllinien.....	31
11.1	K562.....	32
11.2	SW480	32
11.3	Patientenzellen.....	32
11.4	Spenderzellen	32
12	Software.....	32
IV	Methoden.....	33
1	Zellseparation.....	33
1.1	Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus peripherem Blut	33
1.2	Waschen von Zellen.....	33
1.3	Trennung von lebenden und toten Zellen.....	33
1.4	Negative Isolation von T-Lymphozyten	33
1.5	Herstellung von EBV-LCL	34
1.6	Zellzahl und Zellvitalität.....	35
1.7	Herstellen von Patientenserum	35
2	Zellkulturen.....	36
2.1	Tumorzelllinien (AML)	36
2.2	Phänotypisierung der AML Zellen	36
2.3	Stimulationsversuch von T-Lymphozyten mit Blasten einer akuten myeloischen Leukämie.....	36
2.4	Expansion von aktivierten T- Lymphozyten.....	37
2.5	Zytotoxizitäts-Versuch.....	38
2.6	Markieren von Zellen mit PKH 67 Fluorescent Cell Linker Kit	39
2.7	Bestrahlen von Zellen.....	39
2.8	Blockversuch.....	39

2.9	^3H -Thymidin Einbau	40
3	Durchflusszytometrie	40
3.1	Prinzip	40
3.2	Antikörper-Markierung der Zellen	41
3.3	Herstellung von Standardzellen	41
3.4	Bestimmung der Proliferationsraten	41
3.5	Bestimmung der Zytotoxizitätsraten	42
4	HLA-A Typisierung	42
4.1	Prinzip	42
4.2	DNA-Isolation	42
4.3	PCR.....	43
4.4	Gelelektrophorese	43
4.5	Auswertung	43
5	Westernblot	43
5.1	Prinzip	43
5.2	Probenaufbereitung.....	43
5.3	Proteinbestimmung (Biorad-Protein-DC Assay)	43
5.4	Proteinauftrennung mit PAGE (Polyacrylamidgel-Elektrophorese).....	43
5.5	Blotten	44
5.6	Immunfärbung	44
6	Statistik.....	44
V	Ergebnisse	45
1	Charakterisierung der AML Zellen.....	45
1.1	Expression von Oberflächenmarkern	45
1.2	Morphologie	48
1.3	Zytochemische Untersuchungen	48
1.4	Western blot	49
2	Stimulation von T-Lymphozyten durch kultivierte AML Zellen	50
2.1	Allgemeines.....	50
2.2	MTuLR mit allogenen T-Lymphozyten.....	50
2.3	MTuLR mit autologen T-Lymphozyten	51
2.4	Anhalten der Aktivierung	52
2.5	Rolle kostimulatorische Moleküle (am Beispiel von B7.1, B7.2)	52
3	Phänotyp der proliferierenden T-lymphozyten	53

3.1	Allgemeines.....	53
3.2	Aktivierungsmarker.....	53
3.3	CD4 / CD8 Subpopulationen	55
3.4	Andere T-Lymphozyten Subpopulationen	58
3.5	Weitere akzessorische Moleküle	58
4	Zytotoxizität	60
4.1	Allgemeines.....	60
4.2	Zytotoxizität durch inv(16) positive AML Blasten	61
4.3	Zytotoxizität durch inv(16) negative AML Blasten	62
4.4	Blockversuch	63
VI	Diskussion.....	65
1	Allgemeines.....	65
2	Charakterisierung der AML Zellen.....	65
3	Stimulation von T-Lymphozyten durch kultivierte AML Zellen	70
4	Zytotoxizität	73
VII	Zusammenfassung	75
VIII	Summary	77
IX	Literaturverzeichnis.....	79
X	Anhang.....	92
1	Abkürzungsverzeichnis.....	92
2	Dimensionen	95
XI	Ethische Grundlagen und Datenschutz.....	96
XII	Erklärung.....	96
XIV	Danksagung	97

I Einleitung

1 AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE (AML)

1.1 Geschichte

Der Mediziner Rudolf Virchow war der Erste, der die Leukämie 1845 beschrieben hat. Leukämie bedeutet „weißes Blut“ und bezieht sich auf die verbreiterte Leukozytenmanschette (*buffy coat*) auf der Erythrozytensäule nach Zentrifugation des Blutes bei Leukämiepatienten mit sehr hohen Leukozytenzahlen (Herold et al. 2003, S. 74).

1.2 Definition

Die akuten myeloischen Leukämien sind durch einen Zelldefekt in der Hämatopoese der myeloischen Stammzellen gekennzeichnet. Es kommt zu einem Differenzierungsstopp und damit zur autonomen klonalen Expansion unreifer myeloischer Zellen im Knochenmark und Verdrängung der regulären Hämatopoese. Leukämische Zellen können ins Blut ausgeschwemmt werden und dabei extramedulläre Organe infiltrieren (Herold et al. 2003, S. 74).

1.3 Epidemiologie

Die Inzidenz der akuten myeloischen Leukämie steigt mit dem Alter kontinuierlich an. Ebenso wie bei den anderen Formen der Leukämie, überwiegt das männliche Geschlecht.

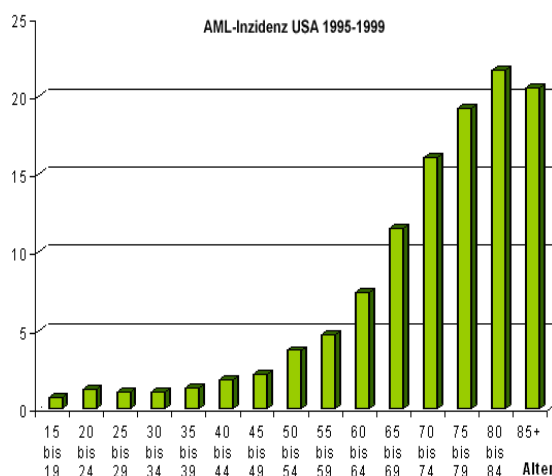


Abb.1a: Inzidenz der Leukämie in den USA

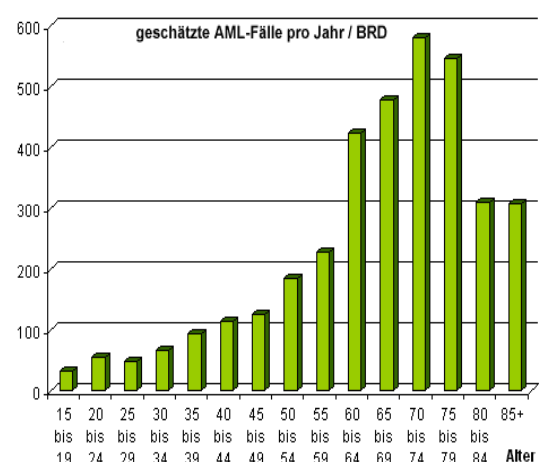


Abb.1b: Geschätzte AML-Fälle in Deutschland

Männer	Frauen
Inzidenz: 4,3/100000 Einwohner	Inzidenz :2,9/100000 Einwohner
(Erwachsene und Kinder)	(Erwachsene und Kinder)

Tab.1: AML Inzidenz aufgeteilt nach Geschlecht
(www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/leukaemiehaeufigkeit)
(Hehlmann et al. 2004)

1.4 Ätiologie

Die Ursache ist in der Mehrzahl der Fälle unbekannt. Bekannt sind chromosomale Aberrationen sowie Knochenmarksschädigung durch Benzol, Zytostatika, Senfgas und ionisierende Strahlung. Nicht selten wird auch die Entwicklung einer sekundären AML aus einem myelodysplastischen Syndrom oder einer Polyzythaemia vera beobachtet (Herold et al. 2003, S. 74).

1.5 Einteilung

Eine AML wird mit Hilfe der FAB-Klassifikation in die Subtypen M1-M7 eingeteilt. Maßgebend sind dabei die Morphologie, die Differenzierungsrichtung und der Reifegrad. Weiterhin spielen die enzymhistochemische Reaktion und Zytogenetik eine wichtige Rolle.

AML-Subtypen	% von AML	Zytochemie positiv für	Zytogenetik
M1 Akute undifferenzierte L. (AUL)	5	-	-
M1 AML ohne Ausreifung	15	POX	inv(3)
M2 AML mit Ausreifung	25	POX	t(8;21)
M3 Akute Promyelozyten-L. (APL)	10	} POX	} t(15 ;17)
M3V Variante mikrogranulozyt. L.			
M4 Akute monomyelozytäre L.	25	POX+Esterase	inv(16),t(16;16)
M5 Akute monozytäre L.	10	Esterase	t(11q ;23)
a) undifferenziert			
b) differenziert			
M6 Akute Erythroleukämie	5	-	del(5),del(7)
M7 Akute Megakaryozytäre L.	5	-	unterschiedl.

Tab.2: FAB-Klassifikation der AML (French-American-British-Group) nach morphologischen Kriterien

Sonderformen: M4eo (mit Eosinophilie)

M2 Baso und M4 Baso (mit Basophilie)

Die WHO hat 1999 einen neuen Vorschlag zur Klassifikation der AML in 4 Gruppen gemacht, die hier verkürzt wiedergegeben wird:

1. AML mit definierten Chromosomenbefunden (Translokationen)
2. AML mit multilinearer Dysplasie (2 oder 3 Zelllinien) mit oder ohne vorbestehendem MDS
3. AML und MDS, therapiebedingt
4. Andere Formen der AML

(Mitrou et al. 2001, S. 68-69)

1.6 Klinik

Häufig werden Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Fieber und Nachtschweiß beschrieben. Die Patienten zeigen Symptome, die infolge der progredienten Knochenmarksinsuffizienz entstehen:

- aufgrund der Leukopenie Anfälligkeit für bakterielle und virale Infekte, besonders Entzündungen an Haut- und Schleimhautübergängen, sowie Pilzinfektionen (z.B. Soor durch *Candida albicans*)
- Blässe, Dyspnoe und Müdigkeit als Folge der Anämie
- Blutungen infolge der Thrombozytopenie oder disseminierter intravasaler Gerinnung

Weitere Symptome können Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie, Knochenschmerzen, hypertrophe Gingivitis, Meningitis leukaemica, leukämische Haut- und Organinfiltrationen sein.

Des Weiteren kann es zu Komplikationen kommen, wie der hämorrhagischen Diathese, Lungenentzündung (meist durch Pilze verursacht) oder anderen schweren Infekten bis hin zur Sepsis, Urat-Nephropathie oder Nephrotisches Syndrom (durch den massiven Kernzerfall) (Renz-Polster et al. 2000, S. 285).

1.7 Diagnostik

Die Sicherung der Diagnose erfolgt mittels eines Differentialblutbildes und dem Knochenmarksbefund mit Morphologie, Zytochemie, Zytogenetik und Immuntypisierung.

Die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut kann erhöht, aber auch normal oder erniedrigt sein (40% der Fälle verlaufen subleukämisch). Thrombozyten, Granulozyten und das Hämoglobin sind oft erniedrigt, die Blutsenkungsgeschwindigkeit, Harnsäure und Laktatdehydrogenase meist erhöht.

Die Knochenmarkszytologie zeigt typischerweise eine erhöhte Zelldichte mit einem hohen Prozentsatz pathologischer, uniformer Zellen. Die Erythropoese und Megakaryopoese sind dabei verdrängt. Allein die Zahl unreifer Zellen (Blasten) sichert die Diagnose einer AML: In einem Ausstrich von peripherem Blut oder Knochenmark müssen mindestens 20% Blasten darzustellen sein. Befinden sich die Blasten nur im Knochenmark, spricht man von einem aleukämischen Verlauf. Fehlen im Knochenmarksausstrich die mittleren Entwicklungsstufen (Myelozyten oder Metamyelozyten), so spricht man von einem Hiatus leucaemicus.

Die Zytochemie, wie die Bestimmung von PAS (p-Aminosalicylsäure), POX (Peroxidase) und Esterase, die Zytogenetik (Suche nach Chromosomenaberrationen) und die Immunophänotypisierung (Bestimmung von Oberflächenmarkern) dienen der besseren Charakterisierung des proliferierenden Klons (Fuchs et al 2007, S.335-340).

1.8 Therapie

Die Therapie sollte meist in Zentren nach Therapieprotokollen innerhalb von Studiengruppen erfolgen.

- Symptomatisch: Unterstützende Behandlung (supportive care): sorgfältige Hygiene, Infektophylaxe, Substitution von Blutprodukten, Prophylaxe einer Uratnephropathie unter Zytostase
- Zytostase: Remissionsinduktionstherapie: (Verminderung maligner Zellen um mindestens Zehnerpotenzen)
Es gibt verschiedene Therapieprotokolle; die meisten Kombinationen enthalten Cytosin-Arabinosid (ARA-C) und ein Anthracyclinderivat.
- Remissionserhaltende Behandlung:
Verschiedene Strategien:
 - Allogene Knochenmarkstransplantation oder Stammzelltransplantation nach myeloablativer Therapie
 - Allogene Knochenmarkstransplantation nach nicht-myeloablativer Therapie
 - Autologe Stammzelltransplantation
 - Therapie der Promyelozytenleukämie (M3) mit All-trans-Retinsäure (ATRA, Tretinoin) bei Nachweis des PML/RAR-Alpha-Gens
 - Therapie mit monoklonalen Antikörpern, z.B. anti-CD33-Antikörpern

(Fuchs et al. 2007, S.361-378)

1.9 Prognose

Die komplette Remission ist definiert durch die Rückkehr zur normalen Knochenmarksmorphologie mit einem Blastenanteil <5%, völliges Verschwinden aller initial vorhandener leukämischen Infiltrationen einschließlich extramedullärer Lokalisationen. Die Remissionskriterien müssen für mindestens vier Wochen nachgewiesen sein (Fuchs et al. 2007).

Bei der definierten Blastengrenze von 5% besteht zwar zytologisch das Kriterium einer Vollremission, dennoch verbleiben bis zu 10^{10} Leukämiezellen im Körper, die weiterhin in der Lage sind zu proliferieren (Yin et al. 1999).

Obwohl 50-75% der Patienten anfangs eine komplette Remission erreichen, erleiden viele der Patienten ein Rezidiv (Cole et al. 1997; Greiner et al. 2008). Das Rezidivrisiko beträgt im Durchschnitt für alle Typen der akuten myeloischen Leukämie über 50 %, die Langzeitüberlebensrate aller Patienten mit AML etwa 20 % (Greiner et al. 2008, Fuchs et al. 2007).

Ungünstige Prognosefaktoren sind dabei:

- Leukozyten >100 000/ μ l
- Alter > 60 Jahre
- Therapiezyklen bis zur Remission > 1
- Zytogenetik: abn(3q), 5/5q, 7/7q, abn(12p), abn(17p), komplex veränderte Karyotypen

1.10 Akute myelomonozytäre Leukämie–Myelomonozytärer Typ mit Eosinophilie (M4eo)

Die AML FAB M4eo wird in etwa 5% der akuten Leukämien gefunden. Sie wird durch den Nachweis von mehr als 20% monozytären Zellen (Monoblast, Promonozyt und Monozyt) und mehr als 20% granulozytäre Zellen (Neutrophile und Vorläufer) bei einem Blastengehalt von über 20% definiert (Kundu et al. 2001).

Bei der M4eo handelt es sich um eine meist auf das Knochenmark beschränkte Eosinophilie ohne Ausschwemmung in das periphere Blut. Pathognomonisch ist dabei das Auftreten von abnormen eosinophilen Granulationen.

Die M4eo ist in den meisten Fällen mit einer chromosomalen Aberration vergesellschaftet. Sie zeigt die zytogenetische Abnormität der Inversion eines Abschnittes des langen Arms des Chromosoms 16 (inv16) oder seltener einen Austausch der Allele, als eine verwandte Form t(16,16). Bei dem Rearrangement der Inversion 16 ist der Transkriptionsfaktor „Core binding factor beta (CBF β)“ auf dem

langen Arm des Chromosoms 16 (Bande q22) mit dem Gen für die Schwereketten des Myosins glatter Muskelzellen (MYH11) des Chromosoms 16 mit der Lokalisation Bande p23 auf dem kurzen Arm des Chromosoms verschmolzen. Es resultiert die Ausbildung des Fusionsgens CBF β -MYH11 (Viswanatha et al. 1998). Der Transkriptionsfaktor CBF ist für die genetische Regulation der Hämopoese und der Osteogenese essentiell.

Das Fusionsprodukt CBF β -MYH11 blockiert und inhibiert die Transkription durch zytoplasmatische Sequestration einer Untereinheit. Dieses Phänomen scheint mit dem Ausbruch der akuten Leukämie beim Menschen eng verbunden zu sein. Das Fusionsgen erzeugt bei den beobachteten Leukämien Transkripte, die zum Nachweis und Quantifizierung durch die PCR Technik geeignet sind (Strout et al. 1999; Shigesada et al. 2004).

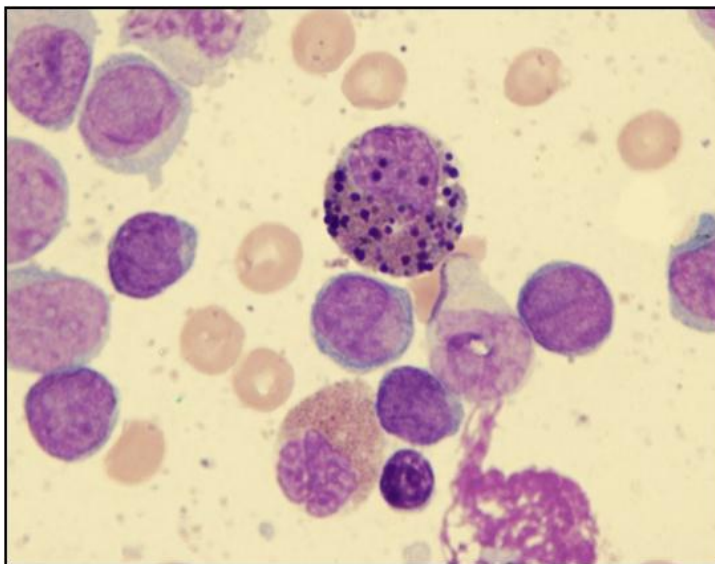


Abb.2: Ausstrichpräparat AML M4eo mit atypischen Eosinophilen (Mitrou et al. 2001)

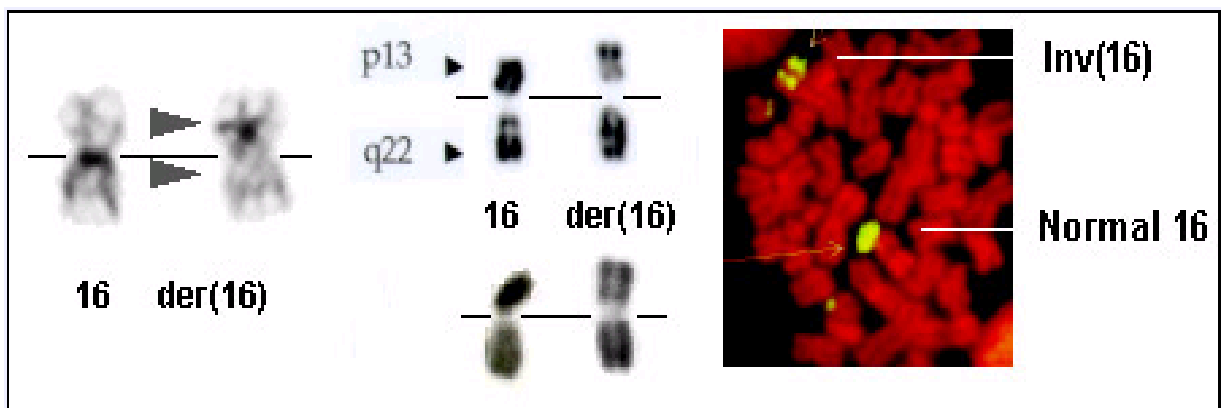


Abb.3: Chromosomendarstellung des Rearrangements der Inversion 16 (infobiogen)

2 DAS IMMUNSYSTEM

2.1 Allgemeines

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes funktionelles System. Es dient der Erhaltung der Individualstruktur durch Abwehr pathogener körperfremder Substanzen (Antigene) und kontinuierliche Elimination anormaler (u.a. maligne entarteter) Körperzellen.

Man kann zwei Untereinheiten unterscheiden, eine unspezifische (angeborene) und eine spezifische (erworbene) Immunität. Die unspezifische Immunantwort erfolgt dabei im Gegensatz zur spezifischen unabhängig von der Art des Antigens. Beide Systeme vermitteln ihre Abwehr sowohl durch humorale als auch durch zelluläre Faktoren.

Die unspezifische angeborene Immunität ist für die frühen Phasen der Immunantwort verantwortlich. An ihr sind natürliche Barrieren wie intakte Haut und Schleimhaut, zelluläre Abwehrmechanismen wie das Monozyten-Makrophagen-System, natürliche Killerzellen, Granulozyten und das Komplementsystem beteiligt.

Die spezifische erworbene Immunität wird selektiv durch Antigene induziert. Sie werden von antigenpräsentierenden Zellen (zirkulierende Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Lymphozyten) in den sekundären Lymphorganen den T-Lymphozyten präsentiert. Es kommt zu einer klonalen Expansion antigenspezifischer T- und B-Lymphozyten, den sogenannten Effektorzellen (späte Phase der Immunantwort). Aus ihnen können nach Antigenelimination Gedächtniszellen entstehen, die bei erneuter Exposition dem gleichen Antigen gegenüber eine effizientere Reaktion des Immunsystems induzieren (Renz-Polster et al. 2000, S.328-333).

2.2 T-Lymphozyten

Bis zu 75% der mononukleären Zellen im Blut sind T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus den pluripotenten Stammzellen. Dort erfolgt eine weitgehend antigenunabhängige erste Proliferationswelle unreifer Vorläuferzellen. Diese wandern dann vom Knochenmark in den Thymus. Hier durchläuft die unreife Vorläuferzelle drei Reifungsstadien. Im Stadium I der T-Zell-Differenzierung kommt es unter dem Einfluß von IL-2 zur Umlagerung/Rearrangement des T-Zell-Rezeptors (TCR). Auf diese Weise entstehen eine Vielzahl von T-Lymphozyten mit TCR unterschiedlicher Affinität. Da diese Zellen weder das CD4- noch das CD8-Oberflächenantigen tragen werden sie als doppelt

negativ bezeichnet. In der nächsten Reifungsstufe erscheinen Moleküle des CD3-Antigenrezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche. Zudem besitzen diese Zellen nun die Oberflächenantigene CD4 und CD8 (doppelt positiv). Im Stadium III der T-Zell-Differenzierung folgt ein entscheidender Schritt zur Reifung der eigentlichen T-Lymphozyten. Als Folge der Interaktion mit dem MHC (major histocompatibility complex) der Thymuszellen findet eine Aufspaltung in zwei Populationen statt, die entweder das CD4- (60%) oder das CD8-Antigen (40%) tragen (einfach positiv). Da der T-Zell-Rezeptor Fremdanigen nur im Zusammenhang mit dem körpereigenen MHC erkennen und binden kann, durchlaufen die naiven T-Lymphozyten zum Schluß einen strengen Selektionsprozess. T-Lymphozyten mit zu hoher oder völlig fehlender Affinität zu MHC werden eliminiert. Dadurch werden im Thymus sowohl autoreaktive als auch funktionsuntüchtige T- Lymphozyten beseitigt (Burmester et al. 2002, S. 8-12).

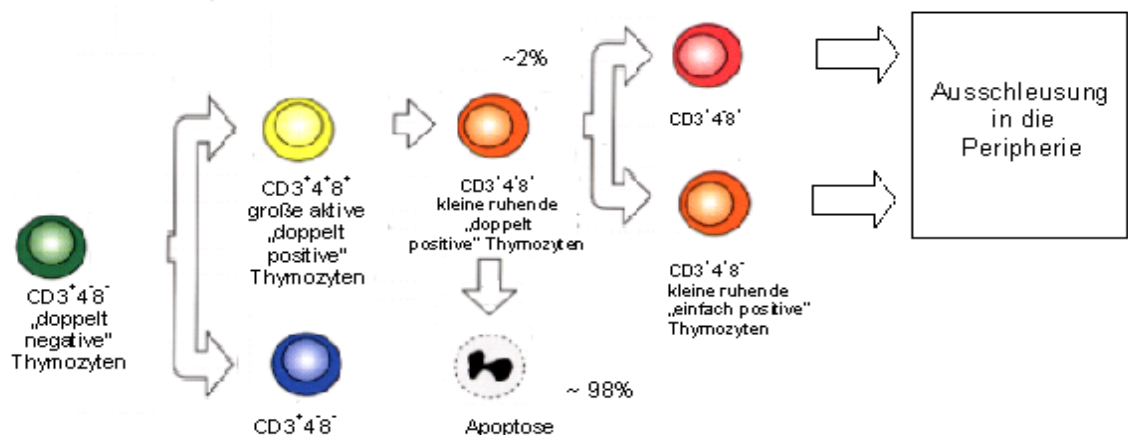


Abb.4: Differenzierung der T-Lymphozyten

Nur 2% aller T-Lymphozyten werden schließlich als naive T-Lymphozyten in das periphere Blut ausgeschleust und wandern in lymphatische Gewebe und zirkulieren bis zu einem eventuellen Antigenkontakt (Mitrou et al. 2001, S. 133-134).

Die reifen T-Lymphozyten können strukturell über die Expression von Oberflächenmarkern wie CD4 und CD8 definiert werden. Die funktionelle Einteilung der reifen T- Lymphozyten erfolgt nach ihrer Rolle am Immungeschehen:

- T-Helferzellen: Die meist $CD4^+$ T-Lymphozyten werden durch den MHC-Klasse-II-Peptid-Komplex aktiviert. Es kommt zur Proliferation und Sekretion verschiedener Zytokine. Die aktivierten $CD4^+$ T-Lymphozyten können

Makrophagen und Killerzellen aktivieren und B-Lymphozyten zur Antikörperbildung anregen.

- T-Supressorzellen: Diese Zellen unterdrücken die Immunantwort anderer T-(v.a. Helfer-) Lymphozyten und B-Lymphozyten, entweder über direkten Zellkontakt oder über Sekretion von Zytokinen.
- Zytotoxische T-Lymphozyten: Diese Zellen mit antigenspezifischer Aktivität gegen virusinfizierte Zellen, Tumorzellen und Zellen histoinkompatiblen Gewebes erkennen das Antigen durch Rezeptoren auf der Zelloberfläche bei gleichzeitiger Bindung an den MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex. Sie sind so in der Lage über die Sekretion von lytischen Enzymen (Perforin, Granzyme, u.a.) peptidexprimierende Zellen zu lysieren. In der Regel exprimieren diese Zellen das Oberflächenmolekül CD8.
- Gedächtniszellen: Manche CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sterben nicht wie die Effektorzellen nach dem Antigenkontakt ab, sondern werden zu langlebigen, funktionell ruhenden, immunkompetenten Gedächtniszellen. Sie ermöglichen bei erneutem Kontakt mit einem bestimmten Antigen eine schnelle Immunantwort.

(Burmester et al. 2002, S.14)

2.3 Antigenpräsentation

Die Stimulation der T-Lymphozyten geschieht vor allem durch Wechselwirkungen mit professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC). Zu den antigenpräsentierenden Zellen zählen zirkulierende Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten. Die wichtigsten Moleküle in diesem Aktivierungsprozess sind die T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf den T-Lymphozyten und die Histokompatibilitätsantigene (MHC-Proteine = Major Histocompatibility Complex) auf den antigenpräsentierenden Zellen.

T-Lymphozyten können Antigene nur in Assoziation mit MHC-Proteinen erkennen. Hierfür müssen diese Antigene zunächst zu Peptidfragmenten verdaut werden, um an die Peptid-bindende Grube der MHC-Proteine (HLA-Antigene) binden zu können. Dabei werden zwei Gruppen von MHC-Molekülen unterschieden: MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II.

Endogene, das heißt innerhalb der Zelle synthetisierte Antigene (unter anderem Tumorantigene) oder virale Proteine werden durch große Proteasomen zu kleinen Peptiden verdaut und dann ins Endoplasmatische Retikulum transportiert. Hier treffen

sie auf MHC-Klasse-I-Proteine. Passen die Peptide in die antigenbindende Region des MHC-Proteins hinein (MHC-abhängige Restriktion), werden die MHC-Peptid-Komplexe über den Golgi-Apparat bis auf die Zelloberfläche transportiert.

Exogene Antigene können entweder über Oberflächenrezeptoren oder endosomale Vesikel eingeschleust und durch Proteasen zu Peptiden verdaut werden. Die Endosomen verschmelzen dann mit Vesikeln, die MHC-Klasse-II-Proteine enthalten. Ähnlich wie bei den MHC-Klasse-I-Proteinen, interagieren die antigenen Peptide mit der antigenbindenden Region der MHC-Proteine und werden als MHC-Peptid-Komplexe auf die Zellmembran transportiert (Germain et al. 1993, Maffei et al. 1998).

2.4 Interaktionen von T- Lymphozyten

Der spezifische T-Zell-Rezeptor geht mit dem MHC-Peptid-Komplex eine Bindung ein. Komplettiert wird diese Bindung durch eine weitere Bindung mit einem CD4- bzw, CD8-Antigen. Die Bindung eines MHC-Peptid-Komplexes unterliegt einer Restriktion, so dass CD4-Zellen nur mit MHC-Klasse-II-Proteinen und CD8-Zellen nur mit MHC-Klasse-I-Proteinen kommunizieren. Anschließend findet über den CD3 Komplex die eigentliche Signaltransduktion statt. Es kommt schließlich zur Gen-Aktivierung und nachfolgender Transkriptionsregulation. Wichtigster Vorgang bei der T-Lymphozyten Aktivierung ist die Transkription des IL-2 Gens.

Für die Entwicklung, Differenzierung bzw. Aktivierung und Antigenerkennung der T-Lymphozyten sind neben dem T-Zell-Rezeptor zahlreiche Hilfsmoleküle erforderlich. Letztere sind besonders an der Bindung zwischen den T-Lymphozyten und den antigenpräsentierenden Zellen beteiligt. Einige dieser Moleküle befinden sich ausschließlich auf den Zellen der T-Zelllinie, so zum Beispiel die CD3- Antigene, während andere auch auf B-Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen vorkommen.

Das CD2 Molekül stellt den Rezeptor für das CD58 (Leukozytenfunktionsantigen)-Antigen dar und ist ein wichtiges Molekül bei der alternativen Aktivierung des T-Lymphozyten. Es ist ein früher Lymphozytenmarker und wird von T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert.

Das CD3 Antigen besteht aus einer Reihe von wichtigen membranständigen Proteinen, die eng mit dem T-Zell-Rezeptor assoziiert sind. Nur in Verbindung mit diesen Molekülen kann eine Signaltransduktion nach Kontakt mit den MHC-Proteinen stattfinden, die dann zur eigentlichen T-Lymphozyten-Aktivierung führt.

Das CD4 Antigen ist charakteristisch für die T-Helfer-Zellen; es wird auch von antigenpräsentierenden Zellen und eosinophilen Granulozyten exprimiert.

Das CD8 Antigen ist charakteristisch für zytotoxische T-Lymphozyten; es wird auch in schwacher Ausprägung auf NK-(Natürlichen Killer-) Zellen exprimiert.

Sowohl CD4- als auch CD8-Antigene interagieren mit der Tyrosinkinase p56^{lck}.

Die Moleküle CD28 und CD152 (CTLA-4) binden an CD80 und CD86 (auch B7.1 und B7.2 bezeichnet) auf antigenpräsentierenden Zellen. Die Interaktion von CD28 und CD80/CD86 liefert ein notwendiges kostimulatorisches Signal für die T-Lymphozyten-Aktivierung und -Proliferation, während die Bindung von CTLA-4 an diese Moleküle ein hemmendes Signal für die T-Lymphozyten darstellt. (Abbas et al. 2005, Kapitel 7, 8)

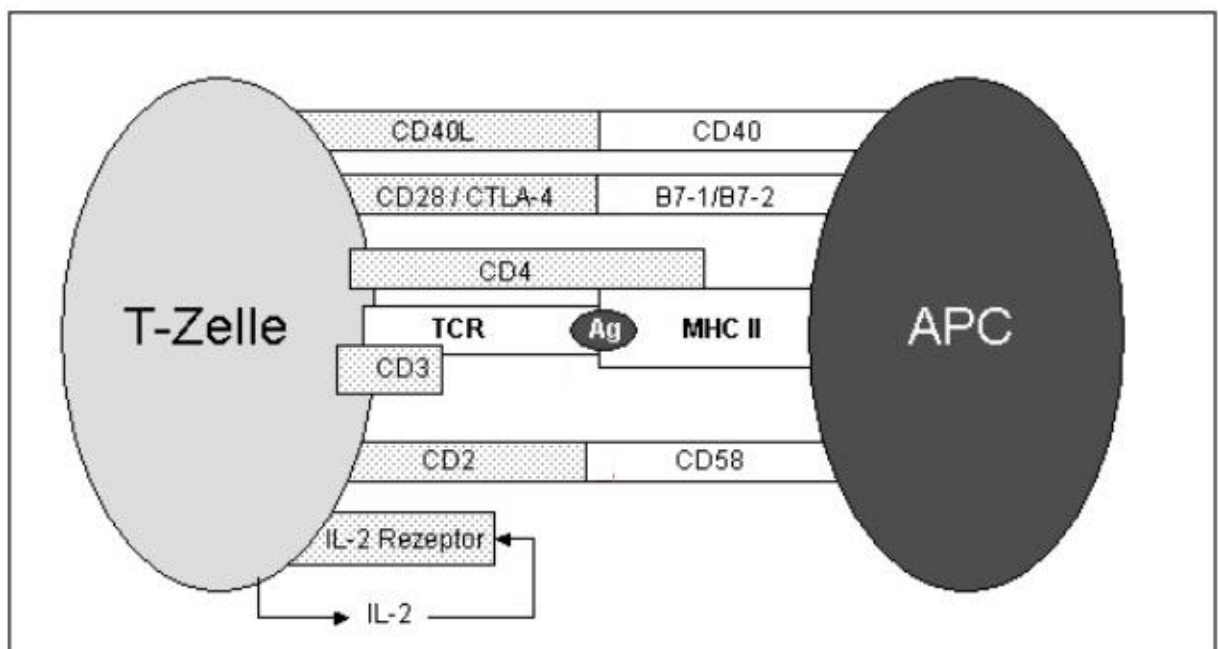


Abb.5: Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyt und APC bei der Antigenerkennung

2.5 Zytotoxische Zellen

Zytotoxische Zellen sind eine heterogene Subpopulation der Lymphozyten. Sie sind in der Lage durch kontaktmedierte Lyse andere Zelltypen zu zerstören. In die Zellfamilie der zytotoxischen Zellen gehören die Makrophagen, die Neutrophilen Granulozyten und vor allem die zytotoxischen T-Lymphozyten und die Natürlichen Killerzellen (NK). Sie stellen die natürliche Verteidigung des Organismus gegen virale, bakterielle und parasitäre Infektionen, insbesondere gegen neoplastische Erkrankungen dar.

Natürliche Killerzellen machen etwa 10 % der Blutlymphozyten aus. Sie tragen das Adhäsionsmolekül CD56, teilweise exprimieren sie auch CD8. Im Unterschied zu den zytotoxischen T-Lymphozyten sind sie nicht antigenspezifisch und können ohne

vorherige Antigenexposition sofort die Zielzelle (v.a. virusinfizierte und bösartig transformierte Körperzellen) zerstören. Die Proliferation der NK-Zellen unterliegt der Regulation der T- Lymphozyten (Helfer- und Supressorzellen). Ihre Aktivität wird v.a. durch Interferone sowie Interleukine und anderen Immunmodulatoren stimuliert.

Die zytotoxischen T- Lymphozyten benötigen zu ihrer Aktivierung unter anderem die Interaktion einem einen MHC-Klasse-I-Peptid-Komplex. Innerhalb weniger Stunden kommt es zu einer massiven Expression des IL-2-Rezeptors, gefolgt von der Produktion von IL-2 und der Transformation zum T-Lymphoblasten. Nach 20-48 Stunden beginnt, vorausgesetzt der zytotoxische T-Lymphozyt erhält adäquate kostimulatorische Signale, die DNA-Synthese und die Zellproliferation. Durch den kontinuierlichen Einfluß von IL-2, das ebenfalls von antigen-spezifisch aktivierten CD4+-Helferzellen gebildet wird, werden in dem T-Lymphoblasten azurophile Granula gebildet. Diese enthalten lytische Proteine, Perforine sowie Serinproteasen, TNF- α und /oder TNF- β . Die großen Lymphoblasten differenzieren dann in reife zytotoxische Effektorzellen mit antigenspezifischer zytolytischer Aktivität. Diese können die zytotoxischen Peptide über einen transmembranalen Kanal in die gebundene Zielzelle freisetzen (Janeway et al. 2002, Kapitel 4,7).

3 ZYTOKINE

3.1 Definition

Interleukine (IL-x) sind zu den Zytokinen zählende Peptidhormone, d.h. sie sind körpereigene Botenstoffe der Zellen des Immunsystems. Das Wort Interleukin kommt dabei aus dem Lateinischen: inter = zwischen und leukos = weiß. Sie vermitteln die Kommunikation zwischen Leukozyten, aber auch anderen an der Immunreaktion beteiligten Zellen (z.B. Makrophagen). Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden sie in mehrere Untergruppen unterteilt, die durch Zahlen gekennzeichnet werden (IL-1 bis IL-35).

Die Wirkung der Interleukine ist dabei höchst unterschiedlich. Interleukine regen spezifisch bestimmte Zellen des Immunsystems zu Wachstum, Reifung und Teilung an oder verhindern genau diese Prozesse der Aktivierung (Horn et al. 2005, S. 408 ff).

3.2 IL-2

Interleukin-2 ist das wichtigste Signal für einen T-Lymphozyten. Nach Erkennen seines Antigens auf dem MHC-Rezeptor einer antigenpräsentierenden Zelle (APC)

schüttet der T-Lymphozyt Interleukin-2 aus. Dieses Signal wirkt hauptsächlich autokrin auf ihn selbst. Durch eine intrazelluläre Signalkaskade kommt es zur Aktivierung und klonalen Teilung der T-Lymphozyten. Haben sie einmal ihr Antigen erkannt, vervielfältigen sie sich, daher gehört dieses Interleukin zu den Wachstumsfaktoren. Neben der autokrinen T-Zellaktivierung wirkt Interleukin-2 auch auf B-Lymphozyten und natürliche Killerzellen mit dem gleichen Effekt. Zur Produktion von T_H2 -Zytokinen wie IL-4 und IL-5 wird IL-2 benötigt.

Therapeutisch ist Interleukin-2 eines der wichtigsten Interleukine (Horn et al. 2005, S. 411).

4 TUMORIMMUNOLOGIE

4.1 Allgemeines

Tumorzellen unterscheiden sich biologisch wesentlich von ihren nicht-malignen Ursprungszellen. Diese Differenzen sind durch während der Tumorentwicklung erworbene genetische Veränderungen bedingt und führen u.a. auch zu der Bildung qualitativ oder quantitativ veränderter molekularer Strukturen in den Krebszellen. Werden solche tumorassoziierten Strukturen vom spezifischen Immunsystem des tumortragenden Wirtes erkannt, spricht man von Tumorantigenen (Boon et al. 1997; Sahin et al. 1999).

An der spezifischen Erkennung von Antigenen sind zelluläre und humorale (durch Antikörper bedingte) Mechanismen beteiligt. In vitro Experimente haben gezeigt, dass die Zerstörung von Tumorzellen in erster Linie jedoch durch zelluläre Abwehr erfolgt, wobei unterschiedliche Komponenten des Immunsystems die antitumorale Reaktivität determinieren (Apasov et al. 1993).

Die natürlichen Killer (NK)-Zellen, aktivierte Makrophagen und Lymphokin-aktivierte Killer (LAK)-Zellen erkennen und eliminieren Tumorzellen unspezifisch, d.h. in Abwesenheit eines spezifischen Tumorantigens. Im Gegensatz dazu stehen die spezifischen Abwehrmechanismen, die T-Zell-vermittelte Zytotoxizität, die Antikörper-vermittelte Komplement-abhängige Tumorzelllyse und die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Diese können nur in Anwesenheit eines Tumorantigens aktiviert werden, wobei die T-Zell-medierten Erkennungsmechanismen für die Tumormunität die Schlüsselrolle spielen (Cantrell et al. 1996; Lanier et al. 1997).

Die potentiell klinisch-therapeutische Bedeutung von Tumorantigenen ergibt sich aus der Tatsache, dass die Erkennung von Antigenen auf neoplastischen Zellen durch

das Immunsystem zur Induktion von zytotoxischen Effektormechanismen führt und die Elimination der Krebszellen bewirken kann. Entsprechend ist es eine zentrale Zielsetzung der Tumorimmunologie, diese Strukturen molekular zu definieren (Falk et al. 1991; De Plaen et al. 1997; Sahin et al. 1999; Van der Bruggen 2002).

4.2 Tumorescapemechanismen

In immunkompetenten Patienten wird das Tumorwachstum durch viele Faktoren reguliert, die zum einen abhängig zum anderen unabhängig von der körpereigenen Immunantwort sind. Tumore, die sich in einem immunkompetenten Patienten entwickeln, sind entweder der Überwachung des Immunsystems entkommen oder die gegen sie gerichtete Immunantwort reicht nicht aus, um das Tumorwachstum zu verhindern. Insbesondere in Hinblick auf die Entwicklung von Immuntherapien hat die Definition und Identifizierung von Mechanismen, die zum „Immune escape“ von Tumoren führen, in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen (Seliger et al. 1999). Tumore entwickeln verschiedene Mechanismen, der Kontrolle des Immunsystems zu entkommen, wobei sie entweder spezifische Immuneffektorzellen inaktivieren oder die Aktivierung von potentiell antitumoralen Effektormechanismen verhindern.

Dies sind im Wesentlichen

- Immunselektion (Selektion von Antigen-negativen Mutanten)
(Jäger et al. 1997)
- antigene Modulation (u.a. Punktmutationen innerhalb des antigenen Peptides)
(Maeurer et al. 1996)
- Alterationen der MHC-Klasse-I und II-Oberflächenexpression
(Restifo et al. 1993; Seliger et al. 1997)
- defiziente MHC-Klasse-I und II-Antigenpräsentation
(Garrido et al. 1997; Garcia-Lora et al. 2003)
- inadäquate Expression von akzessorischen und kostimulatorischen Molekülen
(Hogg et al. 1993; Zheng et al. 1997)
- Defizienzen in der Signaltransduktion von T-Lymphozyten
(Matsuda et al. 1995; Reichert et al. 2002)
- Produktion von tumorassoziierten immunsuppressiven Substanzen
(Enk et al. 1997; Steinbrink et al. 1999)
- Neutralisierung von Immuneffektormechanismen durch das Fas/FasL System
(Walker et al. 1997; Abrams et al. 2005)

Aufgrund der inter- und intratumoralen Heterogenität und der unvollständigen Kenntnis über die synergistischen bzw. antagonistischen Wirkmechanismen in vivo ist die Signifikanz und der Stellenwert der verschiedenen Faktoren für die Entstehung des „Immune escape“-Phänotyps von Tumorzellen bisher nicht eindeutig geklärt. Einiges spricht dafür, dass sich mehrere Immunevasionsprozesse überlagern (Seliger et al. 1999).

II Fragestellung

Die AML ist trotz vieler Fortschritte in der Behandlung aufgrund hoher Rezidivraten und Infektionen bis hin zur Sepsis eine lebensbedrohliche Erkrankung. Obwohl 50-75% Patienten anfangs eine komplette Remission erreichen, erleiden viele der Patienten ein Rezidiv (Cole et al. 1997; Greiner et al. 2008).

Die initiale Remission ist stark abhängig von der biologischen Charakteristik der leukämischen Blasten. Dabei spielt das Vorhandensein von chromosomalen Aberrationen einen wichtigen prognostischen Faktor (Bloomfield et al. 1984; Mrozek et al. 2008). So imponieren einige Untergruppen der AML, die durch eine deutlich bessere Prognose gekennzeichnet sind. Hierzu zählen die AML M2 mit der Translokation t(8;21)(q22;q22), die Promyelozytenleukämie mit der Translokation t(15;17) und die AML M4eo mit der inv(16). (Grimwade et al. 1998; Mrozek et al. 2001)

Die chromosomale Aberration inv(16) ist mit einem bestimmten Phänotyp der Leukämiezellen und einem klassischen klinischen Erscheinungsbild verbunden. Interessant ist, dass Spenderlymphozyteninfusionen oder eine stark ausgeprägte Spender-gegen-Empfänger-Reaktion bei der AML inv(16) zu Langzeitremissionen führten (Au et al. 1999; Greiner et al. 2008). Ebenso konnte rekombinantes IL-2 angewandt über 12 Wochen nach initialem Erreichen einer kompletten Remission bei einer AML inv(16) zu einer Langzeitremission von über 5 Jahren führen (Cortes et al. 1999; Sahin et al. 2007).

Diese klinischen Daten geben Hinweis auf die besondere Immunogenität der inv (16) positiven Blasten.

Chromosomale Aberrationen resultieren oftmals in grundlegenden Veränderungen in der Regulation von Zellproliferation und Apoptose und sind häufig mit der Expression von Fusionsproteinen assoziiert (Mitani et al. 2002). Die chromosomale Aberration der inv(16) (M4eo) und ihrer Varianten resultiert in der Expression des CBF β -MYH11 Fusionsproteins. Solche Fusionsproteine können die molekulare Basis für die Expression von leukämiespezifischen Peptidsequenzen darstellen, die vom Immunsystem erkannt werden und somit eine Immunantwort induzieren können (Bruserud 1999).

Klinische und experimentelle Daten von antileukämischen Effekten nach allogener Stammzelltransplantation und nach Spender-Lymphozyten Infusionen belegen, dass

T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle in der Erkennung leukämiespezifischer Peptidsequenzen spielen (Ringdén et al. 2005).

Diese Ergebnisse ermutigen, nach weiteren immuntherapeutischen Ansätzen zur Behandlung der AML auf der Basis von malignomreaktiven Effektorzellen zu forschen. Vor allem die Eradikation verbleibender Tumorzellen im Stadium des „Minimal residual disease“ ist dabei von großer Bedeutung.

In dieser experimentellen Arbeit wollen wir auf zellulärer Ebene prüfen:

- Ist dieses Fusionsprotein CBF β /MYH11 ein potentiell Kandidatenpeptid für die T-Lymphozyten-spezifische Erkennung durch das Immunsystem?
- Kann die Tumorzelle als eine antigenpräsentierende Zelle (APC) fungieren, sind z.B. kostimulatorische Moleküle vorhanden?
- Kommt es zu einer T-Lymphozyten Aktivierung?
- Lässt sich eine Subpopulation der T-Lymphozyten isolieren?
- Welchen Phänotyp hat diese Subpopulation?
- Ist diese T-Lymphozyten Aktivierung peptidspezifisch ?
- Lässt sich diese durch spezifische Zytotoxizität beweisen?

III Material

1 LABORGERÄTE

1.1	<u>Brutschrank</u>		Heraeus Instruments
1.2	<u>Durchflusszytometer</u>	Epics XL	Beckman Coulter
1.3	<u>Mikroskop</u>	DM IL	Leica
1.4	<u>Pipetten</u>		
	P 20, P 100, P 200, P 1000		Gilson
	Multipette® plus		Eppendorf
	8-Kanal-Pipettiergerät (25-200µl)		
	12-Kanal-Pipettiergerät (25-200µl)		Micronic Systems
1.5	<u>Pipettierhilfen</u>	Pipettboy acu	IBS Integra Biosciences
1.6	<u>Sterile Arbeitsbank</u>		Heraeus Instruments
1.7	<u>Vortex</u>	REAX control	Heidolph
1.8	<u>Wasserbad</u>		GFL®
1.9	<u>Zentrifuge</u>	Multifuge 3S-R Biofuge	Heraeus
1.10	<u>Bestrahlungsgerät</u>	Irradiator OB 29 (Cs ¹³⁷)	Steuerungstechnik + Strahlenschutz GmbH Braunschweig
1.11	<u>PCR-Zubehör</u>		
	Cetus Test Tube Thermostat TCR 100		Perkin Elmer
1.12	<u>Gelelektrophorese-Zubehör</u>		
	horizontale Flachbrett- Gelelektrophoreseapparatur		KEUTZ Labortechnik
	Stromgeber		Biometra
	UV-Transluminator		MAGV
	Polaroidkamera		
	Polaroidfilm (667)		

1.13 Oberflächenscanner

TRACE 96

Berthold

1.14 Zell-Harvester

halbautomatisch

Inotech

2 WEITERE MATERIALIEN

2.1 Blutentnahmesysteme

Butterfly 21G grün, mit Adapter

Kabe Labortechnik

Combi-Stopper

Braun

Ecoject® Plus

Dispomed

2.2 Gewebekulturplatten

24 well mit Abdeckplatte

Suspensionskulturplatte 96 well mit Abdeckplatte

Greiner

NUNCLON™ Surface 96 well

NUNC™

2.3 Kulturflaschen

Zellkulturflaschen 50 ml, 250 ml

BD Falcon

2.4 Pipettenspitzen

Pipetten 10 ml, 25 ml, 50 ml

BD Falcon

Combi-Tips plus 0,5 ml, 5 ml

Eppendorf

Pipettenspitzen gelb, blau

Sarstedt

Pasteur capillary pipettes

WU Mainz

2.5 Röhrchen

konische Röhrchen mit Drehverschluss

BD Falcon

15ml, 50ml

Rundboden, PS, 12 x 75 mm, 5 ml

Greiner Labortechnik

Nunc Cryo Tube™ Vials 1,8 ml

NUNC™

3 MEDIEN

3.1 Kulturmedium

Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco™) eingesetzt, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Gibco™, hitzeinaktiviert), Penicillin-Streptomycin (entspricht 100 IE/ml; Gibco BRL) versetzt wurde.

3.2 Waschmedium

Als Waschmedium wurde oben genanntes Kulturmedium mit nur 5% FCS-Zugabe verwendet.

3.3 Einfriermedium

Als Einfriermedium wurde oben genanntes Kulturmedium mit 20% FCS-Zugabe und 10% DMSO verwendet.

3.4 IL-2-Medium

Um bei einzelnen Versuchen die angewandten Zellen ausreichend mit dem Wachstumsfaktor IL-2 zu versorgen, wurde dem oben genannten Kulturmedium gentechnisch aus E. coli K12 gewonnenes Interleukin 2 (Proleukin; Chiron) in einer finalen Konzentration von 20-50 U/ml zugesetzt.

4 **PUFFER UND REAGENZIEN**

4.1 Ficoll, Trennlösung zur Dichtegradientenzentrifugation

Für die Isolierung von PBMC aus Vollblut und der Trennung von toten und lebenden Zellen wurde Ficoll (Ficoll-PaqueTM PLUS; Amersham Biosciences AB) mit einer Dichte von 1,077 g/ml verwendet.

4.2 Fixationslösung für Durchflusszytometrie

Zum Fixieren gefärbter Zellen wurden diese in PBS mit 5% Formaldehyd-Lösung (Fisher) fixiert.

4.3 Färbe- und Waschpuffer für Durchflusszytometrie

Zum Waschen antikörpermarkierter Zellen wurde PBS mit 5% und zum Färben mit 0,2% bovinem Serumalbumin (Albumin, Bovine; Sigma[®]) benutzt.

4.4 PBS

PBS-Dulbecco (Phosphate Buffered Saline (1x); pH 7,4; PAA) ohne Calcium und Magnesium.

4.5 Heparin

Das Vollblut wurde zur Gerinnungshemmung bei Entnahme mit Heparin-Natrium (Liquemin[®] N 25000; Roche) in einer Konzentration von 250 IE/ml Vollblut versetzt.

4.6 Propidium-Jodid

Propidium-Jodid (Propidium Iodide staining solution; BD Biosciences) wurde zur Unterscheidung toter von lebenden Zellen am Durchflusszytometer verwendet.

4.7 Trypanblau-Lösung

Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Unterscheidung toter von lebenden Zellen mit der Neubauer-Zählkammer am Mikroskop wurde im Verhältnis 1:1 mit Aqua ad iniectabilia verdünnte Trypanblau-Lösung (Trypan blue solution 0,4%; SIGMA) eingesetzt.

4.8 BSA

Bovines Albumin 30% (SIGMA-ALDRICH®)

4.9 FCS

Fetales Kälber Serum wurde zur Anreicherung dem Kultur-, Einfrier- und Waschmedium zugesetzt.

4.10 ³H-Thymidin-Lösung

Das radioaktive Thymidin wird in die DNS der Zelle eingebaut und kann somit die Synthese-Aktivität der Zelle widerspiegeln. Auf diese Weise kann das Proliferationsverhalten der Zelle untersucht werden. (Radiochemical Centre, Amersham, England)

5 **BIOMAGNETEN**

5.1 Isolations-Kits

Zur spezifischen Isolation bestimmter Zell-Subpopulationen werden Isolations-Kits der Firma Dynal® verwendet. Diese enthalten uniforme, superparamagnetische Polystyren-Körner mit einem Durchmesser von 4,5 µm, die auf ihrer Oberfläche spezifische Antikörper tragen.

T Cell Negative Isolation™ Kit

Die sogenannten Dynabeads gehen mit den spezifischen Rezeptoren eine feste Bindung ein, die durch eine Enzymreaktion unter Verlust des funktionsfähigen Rezeptors wieder getrennt werden kann. Zur Gewinnung von T-Lymphozyten mit funktionsfähigem CD2 Rezeptor und ohne Antikörperkontakt, benutzten wir oben genannten Isolationskit, das heißt, B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, Thrombozyten, dendritische Zellen, Granulozyten und Erythrozyten werden mit Hilfe anti-CD14, -CD16a+b, -CD19, -CD36, -CD56, -CD123 und -CD235a beschichteten beads gebunden und entfernt.

5.2 CD3/CD28 T-Zell Expander

Zur Expansion von T-Zell-Klonen wurden ein mit CD3 und CD28 doppelt besetzte Polystyren-Körner (Dynabeads® CD3/CD28 T Cell Expander; Dynal®) eingesetzt.

6 INTERLEUKIN 2

Es wurde gentechnisch aus E. coli K12 hergestelltes Interleukin 2 (Proleukin®; Chiron) in der Endkonzentration von 20-50 U/ml verwendet.

7 PKH 67 GREEN FLUORESCENT CELL LINKER KIT

PKH 67 ist ein grün fluoreszierendes (FITC) Molekül, das sich in die Zellmembran der Zelle einlagert. Auf diese Weise kann eine Zelle unabhängig von ihren Oberflächenmolekülen angefärbt werden.

8 ANTIKÖRPER

Die Antikörper-Stocklösung wird 1: 9 mit PBS verdünnt (Arbeitslösung).

CD-Bez.	Konjugat	Charakterisierung
CD1a	FITC	Präsentationsmolekül für bakterielle Lipide, MHC-Klasse-I-Ähnlichkeit, Thymozyten, B-Zellen, dendritische Zellen
CD 2	FITC/PE	LFA3 Ligand, Schafserythrozytenrez., Rez. für CD48+CD59
CD 3	FITC/PE	T-Zellen (assoziiert mit TCR $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$, Signaltransduktion)
CD 4	FITC	T-Helfer/Inducer-Zellen (Rez. Für MHC II)
CD 8	FITC/PE	zytotoxische/Suppressor-T-Zellen (Rez. MHC I), NK-Zellen, Thymozyten
CD11a	PE	LFA 1 , ICAM-1 binding
CD11c	PE	Rez. für CD18 exprimiert auf Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten, NK-Zellen, assoziiert CTL killing
CD 13	PE	Monozyten, Neutrophile
CD 14	FITC/PE	Monozyten, Makrophagen, Langerhans-Zellen, Rez. für LPS u. LBP
CD 25	FITC	Aktivierte T- und B-Zellen, stimulierte Monozyten und Makrophagen
CD 27	FITC	CD70-Rez., TNF-Rez. ähnliches /Protein
CD 28	FITC	reife Thymozyten, T-Zellen (Kostimulation), Plasmazellen

CD 33	FITC	panmyeloisch, Mehrheit der Monozyten
CD 45	FITC	„leucocyte common antigen“, Signaltransduktion
CD 45RO	FITC	T-Lymphozyten, Gedächtnis(memory)zellen
CD 56	PE	NK-Zellen, T-Zellen (N-CAM)
CD 58	PE	LFA 3, Ligand für CD2
CD 64	FITC	Monozyten, Makrophagen, Dendriten; Phagozytose, Ak- abhängige zelluläre Zytotoxizität
CD 69	FITC	Thymozyten, NK-Zellen, Neutrophile, Eosinophile; früher Aktivitätsmarker für T- und B-Zellen
CD 80	FITC/PE	aktivierte T- und B-Zellen, Makrophagen; Koregulator bei T- Zell-Aktivierung mit CD86, B7.1
CD 83	PE	Dendritische Zellen
CD 86	PE	Gedächtnis-B-Zellen, Monozyten, dendritische Zellen, Endothelzellen, aktivierte T-Zellen; T-Zell-Kostimulation, B7.2, CTLA-4 Ligand
CD 117	PE	hämatopoetische Vorläuferzellen, Gewebsmastzellen; GF- Rezeptor
CD 154	FITC/PE	Aktivierte CD4 ⁺ positive T-Zellen(CD40 Ligand); induziert B- Zell-Proliferation und –Aktivierung, Signal für Ig-Sekretion und Ig-Switch
CD209	PE	DC-SIGN (dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, Makrophagen, dendritische Zellen
IgG1	FITC/PE	unspezifische Bindung freier Ig

(Burmester/Pezzutto, Taschenatlas der Immunologie, Thieme Verlag 1998)

Tab.3.: verwendete Antikörperlösungen

9 HLA-A TYPISIERUNG

Wir benutzten ein SSP-Reagenzienkit für die HLA-A Typisierung auf DNS-Basis (HLA-A SSP Kit, Biotest).

Der Kit enthält:

- PCR-Blöcke, bestehend aus PCR-Gefäßen, die die getrockneten Primer/Nukleotidgemische enthalten
- PCR-Streifen, die für die 24 Ansätze die Negativkontrolle enthalten

- PCR-Cocktail mit PCR-Puffer, Kresolrot und Glycerin
- PCR-Deckelstreifen

Zusätzlich waren noch folgende Materialien erforderlich:

- Taq Polymerase (Perkin Elmer) 5 U/μl
- Agarose
- Gel
- Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml
- DNS-Längenstandard

10 WESTERNBLOT

10.1 Antikörper

CBFβ	Dianova
Anti-Rabbit POD	Amersham

10.2 Chemilumineszenz Reagenzien

ECL-plus	Amersham
----------	----------

10.3 Molekulargewichtsstandard

Rainbow	Amersham
---------	----------

10.4 Weitere Reagenzien

Elektrophoresepuffer (auf 1l Aqua destillata)	Tris-HCl 125 mM	Merck
	Glycin 160 mM	Merck
	SDS 10%	Merck
Probenpuffer für PAGE (2x)	Tris-HCl 100 mM	Merck
	SDS 4%	Merck
	Bromphenolblau 0,2%	Sigma
	Glycerol 20%	Merck
	DTT 200mM	Merck
	PMSF 1 mM in Isopropanol	Roche
Proteasehemmer (auf 5 ml RIPA)	Aprotinin (30μl/ml RIPA)	Sigma
	Sodium orthovanadate 100 mM	Merck
	Othadiae acid 10 mM	Merck
	Leupeptin (1μg/ml RIPA)	Roche
RIPA	Nonidet-P40 1%	Amaresco
	Sodium deoxycholate 0,5%	Sigma

	SDS 0.1%	Sigma
	PBS (1x)	Dulbecco
Transferpuffer	Tris-HCl 25mM	Merck
(auf 1l Aqua destillata)	Glycin 160mM	Merck
	Methanol 20%	Merck
	SDS 0.1%	Merck
Waschpuffer	PBS (1x)	Dulbecco
	0.1% Polysorbat-20	Merck
Blockingpuffer	PBS (1x)	Dulbecco
	0.1% Polysorbat-20	Merck
	5% Magermilchpulver	Nestlé

11 ZELLINIEN

11.1 K562

Es handelt sich dabei um Zellen einer humanen chronisch myeloischen Leukämie während einer Blastenkrise. Sie eignen sich besonders gut für Versuchsansätze zur Testung der Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen. Sie ist erhältlich bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

11.2 SW480

Hierbei handelt sich um Zellen eines humanen Adenokarzinoms des Colons Grad III-IV. Auch diese Zelllinie ist bei der DSMZ erhältlich.

11.3 Patientenzellen

Es wurden periphere mononukleäre Zellen, sowie Knochenmarksaspirat von Patienten mit AML unterschiedlichen Karyotypen eingesetzt.

11.4 Spenderzellen

Es wurden periphere mononukleäre Zellen von 5 freiwilligen gesunden Spendern eingesetzt.

12 SOFTWARE

Die Arbeit wurde mit Microsoft Word 2007 erstellt. Die Ergebnisauswertung erfolgte mit Microsoft Excel 9.0.

Als Software zur Auswertung der Durchflusszytometriedaten wurde Expo 32.0 verwendet

IV Methoden

1 ZELLSEPARATION

1.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus peripherem Blut

Ausgangspunkt jeder Zellseparation waren entweder 40 ml heparinisiertes Vollblut/Citrat-Vollblut oder 10-40 ml heparinisiertes Knochenmarksaspirat. Dieses wurde dann 1: 4 mit PBS verdünnt und 20 ml Ficoll-PaqueTM PLUS mit 20 ml dieser Suspension in 50 ml Röhrchen überschichtet und 25 min bei 1200 g ohne Bremse zentrifugiert.

PBMC wurden an der Interphase zwischen Plasma und Ficoll vorsichtig abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen.

1.2 Waschen von Zellen

PBMC werden in 40 ml PBS aufgenommen und für 8 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand dekantiert und das Zellpellet resuspendiert.

1.3 Trennung von lebenden und toten Zellen

Da eine zu grosse Anzahl toter Zellen die Kultur lebender Zellen ungünstig beeinflusst, werden mit Hilfe von Ficoll-Trennlösung die toten von den lebenden Zellen getrennt. Hierzu wurden 5 ml Ficoll in 10 ml Röhrchen vorgelegt und mit 5 ml Zellsuspension ($0,5 - 3 \times 10^6$ Zellen/ml) überschichtet und 25 min bei 1200 g ohne Bremse zentrifugiert.

Lebende Zellen wurden an der Interphase zwischen Medium und Ficoll vorsichtig abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und wieder in Kulturmedium aufgenommen.

1.4 Negative Isolation von T-Lymphozyten

Die negative T-Lymphozyten Isolierung ist eine indirekte Form der Isolierung. Dazu werden die mononukleären Zellen mithilfe der Ficoll-Trennlösung (siehe IV.1.1) aus dem mit Heparin versetzten Vollblut isoliert und gekühlt.

Dann müssen die Dynabeads[®] zunächst gewaschen werden. Man benötigt 100 µl Dynabead[®]-Lösung für 1×10^7 mononukleäre Zellen. Die entsprechende Menge Dynabeads[®] wird in ein 15 ml-Röhrchen (Greiner) gegeben und für eine Minute an den Magneten (DynaL MPC[®]) gestellt. Die Dynabeads[®] haften an der dem Magneten zugewandten Seite des Röhrchen, so dass die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt

werden kann. Danach werden die Dynabeads® wieder in der ursprünglichen Menge PBS/0,1% BSA aufgenommen.

Um die T- Lymphozyten von den unerwünschten Zellen zu trennen, werden die mononukleären Zellen mit einem Gemisch aus verschiedenen Antikörpern gegen B Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten und aktivierte T Lymphozyten inkubiert. Dafür werden die mononukleären Zellen in 100 - 200 µl PBS/0,1% BSA pro 1×10^7 Zellen aufgenommen. Danach gibt man pro 1×10^7 Zellen 20 µl hitzeinaktiviertes FCS und 20 µl Antikörpermischung hinzu. Diese Suspension sollte nun bei 2-8°C für 10 min inkubieren. Anschließend werden 1 ml PBS/0,1% BSA pro $1-5 \times 10^7$ Zellen dazugegeben und bei 500 g für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert. Die Zellen werden wieder in 0,9 ml PBS/0,1% BSA pro 1×10^7 Zellen aufgenommen und mit den gewaschenen Dynabeads® bei 20°C für 15 min inkubiert. Während der Inkubation sollte das Röhrchen mit der Zellsuspension immer leicht geschwenkt werden. Während dieses Vorgangs inkubieren die Dynabeads® mit den Antikörper tragenden Zellen.

Danach wird die Zell-Dynabeads®-Suspension, in der sich Dynabeads®-Rosetten gebildet haben, vorsichtig 5-6 mal resuspendiert und mit 1-2 ml PBS/ 0,1% BSA pro 1×10^7 Zellen aufgefüllt .

Anschließend wird das Röhrchen an den Magneten gestellt. Die Dynabeads® mit den gebundenen Zellen werden an die Wand des Röhrchens gezogen, sodass der Überstand mit den T- Lymphozyten entnommen werden kann. Die so gewonnenen Zellen werden dann in PBS gewaschen und anschließend in RPMI Kulturmedium aufgenommen.

1.5 Herstellung von EBV-LCL

Mithilfe der E-Rosettierung werden T-Lymphozyten separiert. Die Methode basiert auf der Bindungsaffinität des CD2-Moleküls auf der Oberfläche humaner T-Lymphozyten zu einem Protein auf der Oberfläche von Schafserythrozyten (LFA-3, lymphocyte function associated molecule-3). Die durch die Rosetten-bildung erreichte erhöhte Dichte der Aggregate macht man sich bei dieser Trennung von T- und B-Lymphozyten zunutze.

30 ml Schafserythrozytensuspension werden zweimal mit PBS gewaschen (800g, 10 min, ohne Bremse). Der leukozytenreiche Ring auf den Erythrozyten wird abgesaugt. Die Erythrozyten werden anschließend in 20 ml Kulturmedium aufgenommen und nach Zugabe von 0,5 ml Test-Neuramidase (1 U/ml) für 30 min im Wasserbad bei

37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die Erythrozyten erneut zweimal mit PBS gewaschen und dann mit Kulturmedium auf eine 10%ige Schafserythrozytenlösung verdünnt.

Die zu trennenden mononukleäre Zellen (max. 40×10^6 Zellen) werden in 4-5 ml Kulturmedium (10%) aufgenommen, gut resuspendiert, mit 1 ml der 10%igen Schafserythrozyten-Suspension gemischt und im Rundboden-Röhrchen vorsichtig über 3 ml Ficoll-Trennlösung geschichtet. Nach Zentrifugation (800g, 20 min, ohne Bremse) werden die nicht-rosettierten Zellen (E- - Zellen = B- Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze abgenommen und anschließend 2x mit PBS gewaschen.

Die nach der E-Rosettierung angereicherte B-Zellfraktion wird mit EBV-haltigem Überstand der Zelllinie B95-8 für 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach werden die Zellen zweimal gewaschen und mit Kulturmedium in 50 ml Kulturflaschen bei 37°C inkubiert. Nach 2-3 Wochen wachsen die EBV transformierten B-Zellen kontinuierlich in Kultur und können als Stimulator- oder Targetzellen verwendet werden.

1.6 Zellzahl und Zellvitalität

Zellzahlen werden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zu diesem Zweck wird Zellsuspension entnommen und 1:1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt.

Dieser Farbstoff wird von toten Zellen aufgrund ihrer Membrandysfunktion aufgenommen, so dass sich diese im Mikroskop leicht von ungefärbten lebenden Zellen unterscheiden lassen.

Die Zellkonzentration in der Zellsuspension berechnet sich aus der Multiplikation der Zellzahl in einem Eckquadrat (entspricht $\frac{1}{10}$ µl) und dem Verdünnungsfaktor 2 (1: 1 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung). Durch Multiplikation mit dem Faktor 1×10^4 erhält man die Zellzahl/ml Zellsuspension.

1.7 Herstellen von Patientenserum

Das mit Heparin versetzte Vollblut wird für 10 min bei 800g zentrifugiert. Es trennt sich dabei in eine obere Serumphase und eine untere korpuskuläre Phase auf. Aus der oberen Phasen wird 1 ml Serum entnommen und im Einfrierröhrchen bei -20°C aufbewahrt.

2 ZELLKULTUREN

2.1 Tumorzelllinien (AML)

Tumorzellen (1×10^7), gewonnen wie in Abschnitt IV 1.1 beschrieben, werden in eine 250 ml Kulturflasche mit 50 ml Kulturmedium gegeben. Diese Kulturflaschen werden zur Inkubation liegend bei 37°C und 5% CO₂ Gasanteil bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank aufbewahrt. Das Kulturmedium wird alle drei Tage gewechselt (siehe IV.1.2). Einmal pro Woche werden die lebenden von den toten Zellen getrennt (siehe IV.1.3).

2.2 Phänotypisierung der AML Zellen

Sowohl die frisch isolierten Tumorblasten als auch bereits vier Wochen kultivierten Blasten werden auf folgenden Oberflächenantigene untersucht (siehe IV.3.2):

- (1) Autofluoreszenz
- (2) IgG1 FITC / IgG1 PE
- (3) CD3 FITC / CD45 PE
- (4) CD45 FITC / CD14PE
- (5) CD3 FITC / CD11a PE
- (6) CD3 FITC / CD11c PE
- (7) CD13 FITC / CD33 PE
- (8) CD80 FITC / CD86 PE
- (9) CD64 FITC / CD117 PE
- (10) CD1a FITC / CD209 PE
- (11) CD2 FITC / CD83 PE

2.3 Stimulationsversuch von T-Lymphozyten mit Blasten einer akuten myeloischen Leukämie

Aus dem mit Heparin versetzten Vollblut gesunder Spender und Patienten wird zuerst Serum gewonnen und eingefroren (siehe IV.1.6), anschließend werden die T-Lymphozyten isoliert (siehe IV.1.4). Diese werden in Kulturmedium aufgenommen und in einer 24-well Platte (Greiner) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/well für 11 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Je nach Ansatz werden bestrahlte AML-Zellen (siehe IV.6.6) in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/well dazugegeben.

Pro Patient erfolgen 6 Ansätze:

- (1) T- Lymphozyten des Patienten + AML Blasten des Patienten

- (2) T- Lymphozyten des Patienten + Medium
- (3) T- Lymphozyten des Patienten + EBV-LCL
- (4) T- Lymphozyten des Spenders + AML Blasten des Patienten
- (5) T- Lymphozyten des Spenders + Medium
- (6) T- Lymphozyten des Spenders + EBV-LCL

An den Tagen 3 und 7 wird frisches Medium und IL-2 in einer Endkonzentration von 20 U/ml hinzugefügt. Zur Restimulation werden an Tag 3 1×10^5 und an Tag 7 5×10^4 bestrahlte AML Zellen (siehe IV.2.6) in die Ansätze (1) und (4) dazugegeben. An Tag 11 werden die Zellen der verschiedenen Ansätze in Kulturmedium aufgenommen und mittels Ficoll (siehe IV.1.2) die lebenden von den toten Zellen getrennt.

An Tag 0, 3, 7 und 11 werden die Zellen am Durchflusszytometer auf ihre Oberflächenmoleküle untersucht (siehe IV.3.2). Dabei werden folgende Oberflächenantigene bestimmt:

- (1) Autofluoreszenz
- (2) IgG1 FITC / IgG1 PE
- (3) CD3 FITC / Standardzellen + Propidium Jodid EDC
- (4) CD3 FITC / CD8 PE
- (5) CD4 FITC / CD8 PE
- (6) CD3 FITC / CD56 PE
- (7) CD25 FITC / CD8 PE
- (8) CD27 FITC / CD8 PE
- (9) CD28 FITC / CD8 PE
- (10) CD154 FITC / CD3 PE
- (11) CD11a FITC / CD3 PE
- (12) CD45RO FITC / CD8 PE
- (13) CD69 FITC

Der Messung (3) werden 1×10^5 Standardzellen (siehe IV.3.3) und 5 μ l Propidium Jodid zur quantitativen Analyse der T-Lymphozyten Population zugegeben.

2.4 Expansion von aktivierten T- Lymphozyten

Zur polyklonalen Expansion werden die stimulierten Zellen (IV.2.2) mit Dynabeads[®] CD3/CD28 T Cell Expander und 20 U IL-2/ml versetzt und in einer 96-well-Kulturplatte (NUNCLON[®]) in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/well bei 37°C und 5% CO₂ für 5-9 Tage kultiviert . Das Verhältnis von Dynabead[®] zu T-Lymphozyten beträgt dabei 1:1. Mit anti-CD3/anti-CD28-beschichteten Beads stimulierte Zellen

weisen eine höhere Proliferationsrate und eine erhöhte IL-2 Synthese auf als Zellen, die mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert wurden (Schwarz et al 2007). Die Stimulation mit Beads ist wesentlich physiologischer als die mit Thapsigargin (blockiert die SERCA- Pumpe des endoplasmatischen Retikulums), PHA oder Antikörpern in Lösung.

2.5 Zytotoxizitäts-Versuch

Zur Bestimmung der Zytotoxizität werden die expandierten T- Lymphozyten (siehe IV.2.3) in einer 96-well Platte in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/well ausplattiert. Den T- Lymphozyten werden je nach Ansatz und soweit verfügbar folgende AML Zellen oder PBMC (siehe IV.6.6) in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/well hinzugefügt. Die AML Zellen und PBMC werden vor der Kokultur mit PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit markiert (siehe IV.2.5) und bestrahlt (siehe IV.2.6).

- (1) T- Lymphozyten
- (2) T- Lymphozyten + AML Blasten stimulierend
- (3) Medium + AML Blasten stimulierend
- (4) T- Lymphozyten + AML Blasten inv16 HLA-A matched allogene
- (5) Medium + AML Blasten inv16 HLA-A matched
- (6) T- Lymphozyten + AML Blasten inv16 HLA-A mismatched allogene
- (7) Medium + AML Blasten inv16 HLA-A mismatched
- (8) T- Lymphozyten + AML Blasten anderen Karyotyps allogene
- (9) Medium + AML Blasten anderen Karyotyps
- (10) T- Lymphozyten + AML Blasten anderen Karyotyps allogene
- (11) Medium + AML Blasten anderen Karyotyps
- (12) T- Lymphozyten + K562
- (13) Medium + K562
- (14) T- Lymphozyten + SW 480
- (15) Medium + SW 480
- (16) T-Zellen + PBMC eines Spenders allogene
- (17) Medium + PBMC eines Spenders
- (18) T- Lymphozyten + EBV-LCL
- (19) Medium + EBV-LCL

Nach 4, 12, 18, 24 und 48 Stunden wird am Durchflusszytometer eine quantitative Analyse der durch die T-Lymphozyten zerstörten AML Zellen bzw. PBMC

durchgeführt. Dazu werden den einzelnen Meßproben jeweils 1×10^5 Standardzellen (siehe IV.3.2) und 5 μ l Propidium Jodid zugegeben.

2.6 Markieren von Zellen mit PKH 67 Fluorescent Cell Linker Kit

Zur besseren Differenzierung der AML-Zell/PBMC-Population von den T-Lymphozyten am Durchflußzytometer, werden die AML Zellen/PBMC vor der Kokultur mit den aktivierten T- Lymphozyten (siehe Zytotox IV.2.4) mit PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit markiert.

Das Zentrifugat von 5×10^6 Zellen wird in 500 μ l Diluent C (wird mit PKH 67 Green Fluorescent Cell Linker Kit geliefert) resuspendiert. Danach werden 4 μ l PKH 67 mit 1 ml Diluent aufgenommen; 500 μ l davon werden der Zellsuspension zugegeben und 4 min bei 25°C ohne Lichteinwirkung inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit 1 ml BSA gestoppt. Nach 1 min Inkubationszeit werden 2 ml RPMI-Medium dazugegeben und die Suspension 10 min bei 400 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand dekantiert und die Zellen noch zwei Mal mit RPMI-Medium gewaschen.

2.7 Bestrahlen von Zellen

Um die Proliferationsaktivität der Tumorzellen zu minimieren, werden sie radioaktiv bestrahlt. Ziel der Dosisfindung war, dass die Tumorzellen nicht weiter proliferieren aber dennoch vital sind.

Zum Bestrahlen werden die Zellen in der gewünschten Konzentration in Kulturmedium aufgenommen und in ein 15 ml-Röhrchen gegeben. Die Zellen werden im Bestrahlungsgerät einer Cs^{137} - γ -Strahlenquelle ausgesetzt (AML Zellen: 90 Gy, PBMC: 30 Gy).

2.8 Blockversuch

Um festzustellen, ob die Zytolyse der AML Blasten durch die T-Lymphozyten von einer Bindung an den MHC-Klasse-I-Rezeptor abhängig ist, wurde ein Blockversuch durchgeführt. Dazu wurden vor dem Zytotoxizitätsversuch die AML Blasten mit anti-MHC-Klasse-I oder -II oder die T-Lymphozyten mit anti-CD4 oder -8 spezifischen monoklonalen Antikörpern in einer Konzentration von 5 μ l Antikörper/ 1×10^5 Zellen für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die AML Blasten mit PBS gewaschen und dann wie in (IV.2.5) beschrieben weiter verarbeitet.

2.9 ³H-Thymidin Einbau

Um das Proliferationsverhalten von T-Lymphozyten auf verschiedene Stimuli (z.B. Zytokine, Mitogene, Stimulatorzellen, etc.) zu untersuchen, können Mikrokulturen mit radioaktiv markiertem Thymidin versehen werden, dessen Einbau in die DNS die Synthese-Aktivität der Zellen in bestimmten Markierungszeiträumen widerspiegelt und somit als Maß der Proliferation gilt. Die Zellkulturen werden in 96-Loch-Mikrotiterplatten gegeben, pro Loch werden 20 µl einer ³H-Thymidin-Lösung (spezifische Aktivität: 1 µCi/Vertiefung) zugegeben und für 5-6 Stunden bei 37°C und 6% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Mit Hilfe eines halbautomatischen Zell-Harvester werden die Kulturen auf Glasfiltermatten transferriert und diese für 2 Stunden im Trockenschrank getrocknet. Die β-Emission kann nun im ortssensiblen Oberflächenscanner gemessen werden.

3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

3.1 Prinzip

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften von Zellen ebenso charakterisieren wie die Expression von Oberflächenmolekülen (Immunphänotypisierung).

Im Zytometer werden die Zellen einzeln am Messpunkt in einen Laserstrahl gelenkt. Durch Streuung des Laserlichtes werden sowohl die Zellgröße (FS=forward scatter), als auch die Zellstruktur (SS=side scatter) erfasst.

Zur Bestimmung von Oberflächenantigenen werden die Zellen mit farbstoffgekoppelten Antikörpern inkubiert, deren Fluoreszenzmoleküle durch das Laserlicht zur Lichtemission angeregt werden. Nach Verstärkung durch einen Photomultiplier wird das emittierte Licht durch spezifische Detektoren erfaßt, die Meßwerte digitalisiert und mittels einer speziellen Software ausgewertet.

Als Kontrolle dienen sowohl ungefärbte (Autofluoreszenz) als auch mit einem Zweitantikörper gefärbte Zellen (zur Erfassung von unspezifischer Bindung). Zum Nachweis der Koexpression mehrerer Oberflächenmoleküle können die Zellen simultan mit bis zu vier unterschiedlich markierten Antikörpern inkubiert werden.

Zur Bestimmung der Quantität wird der Probe eine definierte Menge an Standardzellen (siehe IV.3.2) zugegeben. Diese lassen sich durch ihre Färbung als homogene Population im Dotplot gut abgrenzen und erlauben so Rückschlüsse auf die Zellzahl der ursprünglichen Probe.

3.2 Antikörper-Markierung der Zellen

Die Zellen werden in einer 96-well-Platte (max. 5×10^5 /well) bei 350 g 4 min abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 50 μ l Antikörper-Arbeitslösung resuspendiert und 30 min bei 2-8°C inkubiert. Danach folgen zwei Waschvorgänge mit PBS/FCS 2%. Die gewaschenen Zellen werden in 300 μ l PBS aufgenommen und in die für das Zytometer vorgesehenen Röhrchen pipettiert.

3.3 Herstellung von Standardzellen

Die Tumorzellen der Linie K562 (DSMZ) werden dafür zunächst radioaktiv bestrahlt (siehe Kapitel IV.2.3). Zellen der Linie K562 exprimieren zu 95%-99% den Oberflächenmarker CD13. Sie werden mit PE-konjugiertem anti-CD13 in einer Konzentration von 10 μ l/ 1×10^6 Zellen 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen in PFA 5% auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.4 Bestimmung der Proliferationsraten

Um bei der Auswertung am Durchflusszytometer auch eine quantitative Aussage darüber treffen zu können, wie sich die einzelnen Zellpopulationen im Vergleich zum Ausgangswert (z.B. an Tag 0) verhalten, werden den einzelnen Messungen jeweils 1×10^5 Standardzellen und 5 μ l Propidiumjodid hinzugegeben. Die Standardzellpopulation fluoresziert so stark PE, dass die übrige Messung dadurch nicht gestört wird. Die Berechnung der Proliferationsraten erfolgt aus dem Vergleich der lebenden T-Lymphozyten Population im Verhältnis zur Menge der Standardzellen an Tag 0 mit jenem Verhältnis an den folgenden Tagen. Daraus ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{\text{Standardzellen Tag 0 (\%)}}{\text{T – Lymphozyten Tag 0 (\%)}} \times \frac{\text{T – Lymphozyten Tag x (\%)}}{\text{Standardzellen Tag x (\%)}} = \text{Proliferationsrate}$$

Tag 0= Kontrolle

Proliferationsraten von 1,0 entsprechen keiner Änderung des Zellzahlverhältnisses, Proliferationsraten >1,0 einem Zuwachs der T-Lymphozyten, Raten unter 1,0 einer Verringerung/Absterben von T-Lymphozyten.

3.5 Bestimmung der Zytotoxizitätsraten

Auch zu diesen Messungen wurden zur Bestimmung des Verhältnisses der einzelnen Populationen zueinander die Standardzellen in definierter Anzahl hinzugegeben.

Zur Berechnung der getöteten Tumorzellen berechnet man zunächst den prozentualen Anteil der nach dem Zytotoxizitätsversuch verbliebenen Tumorzellen aus der Division der Tumorzellen im Verhältnis zum Anteil der Standardzellen zum jeweiligen Zeitpunkt. Zur Errechnung der getöteten Tumorzellen wird dieses Ergebnis von 1 subtrahiert und zur Erlangung eines Prozentwertes mit 100% multipliziert.

$$1 - \frac{\text{Tumorzelle n Tag 0 (\%)}}{\text{Standardzellen Tag 0 (\%)}} : \frac{\text{Tumorzelle n Tag x (\%)}}{\text{Standardzellen Tag x (\%)}} \times 100 = \text{getötete Tumorzellen (\%)}$$

Tag 0= Kontrolle Tag x=Ende Zytotoxizitätsversuch

4 **HLA-A TYPISIERUNG**

4.1 Prinzip

Der Biotest HLA-A SSP Kit ist ein Testsystem zur Typisierung von HLA-A Merkmalen mit Hilfe der PCR-Technik. Die SSP-Methode nutzt allelspezifische Primer in der Amplifikationsreaktion zur Typisierung. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass nur Primer, deren Sequenzen vollständig komplementär zur Zielsequenz einer vorliegenden DNA-Probe sind, an diese DNA binden und in einer PCR-Reaktion ein Amplifikat erzeugen. Nicht komplementäre Primer dagegen binden nicht an die DNA, und es findet keine Amplifikation statt.

Die Zusammensetzung der Primermixe erlaubt die eindeutige Zuordnung der HLA-Merkmale A*01-A*80.

4.2 DNA-Isolation

Mittels Ficoll isolierte PBMC werden in Lysis Puffer aufgenommen, zusammen mit Proteinase K Solution in ein Eppendorfgefäß gegeben, im Thermoblock bei 56 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand mit dem denaturierten Protein wird mit Ethanol (96%) versetzt und in ein QIAamp-spin-Column-Röhrchen gegeben. Die DNA bindet an die Filtermembran des Röhrchens und wird in mehreren Waschvorgängen mit verschiedenen Waschpufferlösungen (AW1, AW2) gereinigt. Die isolierte DNA wird mit Aqua ad iniectabilia (auf 70 °C vorgewärmt) aus der Filtermembran herausgewaschen.

4.3 PCR

Die DNA aus 4.1 wird mit dem Master Mix, bestehend aus PCR-Cocktail, Taq Polymerase, in ein PCR-Hütchen, die die getrockneten Primer/Nukleotidgemische bereits enthalten, gegeben und in der PCR-Maschine amplifiziert (30 Zyklen).

4.4 Gelelektrophorese

Das Amplifikat der PCR wird mit Ladepuffer versetzt und in einem Agarose (2%)-Gel bei 8 V/cm Elektrodenabstand elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wird zur Dokumentation auf einem UV-Transluminator fotografiert.

4.5 Auswertung

Für die Auswertung wird das Muster der spezifischen Banden auf das beigegefügte Auswerteschema übertragen und das Typisierungsergebnis mit Hilfe des Reaktionsschemas abgelesen.

5 **WESTERNBLOT**

5.1 Prinzip

Die Technik besteht aus der elektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemisches in einem Polyacrylamid(PA)-Gel mit nachfolgendem immunologischem Nachweis der auf eine feste Phase übertragenen spezifischen Proteinbanden.

5.2 Probenaufbereitung

Das eisgekühlte Zellpellet wird in RIPA (Radioimmunopräzipitations Assay) Puffer mit Proteasehemmern lysiert und anschließend abzentrifugiert. Etwa 10 µl des Überstandes werden zur Proteinbestimmung eingesetzt.

5.3 Proteinbestimmung (Biorad-Protein-DC Assay)

Der Überstand aus 5.2 wird 1: 5 mit Reagenz A und 1: 40 mit Reagenz B versetzt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur wird der Proteingehalt am Spektralphotometer bei 750 nm bestimmt.

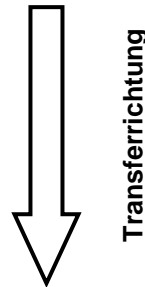
5.4 Proteinauftrennung mit PAGE (Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

Zur Proteinauftrennung sollten 50-100 µg Protein eingesetzt werden, welches 1: 1 mit Probenpuffer (Ladepuffer) und Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) versetzt gekocht wird. Nach dem Kochen wird das Proteingemisch auf ein PAGE-Gel aufgetragen und eine Stunde bei 90 V aufgetrennt.

5.5 Blotten

PAGE-Gel, die gewässerte PVDF-Membran und Whatman Paper werden in Transferpuffer equilibriert. Das Sandwich für den Blot setzt sich wie folgt zusammen:

- Kathode
- drei Lagen Whatman Paper
- PVDF-Membran
- PAGE-Gel
- drei Lagen Whatman Paper
- Anode



Der Blot wird für 45 min bei 38 V angeschlossen, so dass die Proteine von dem PAGE-Gel auf die PVDF-Membran übertragen werden.

5.6 Immunfärbung

Nach dem Blotten wird die PVDF-Membran in Waschpuffer gespült und anschließend für eine Stunde im Blockingpuffer equilibriert. Danach wird der Blockingpuffer abgegossen und die PVDF-Membran für eine Stunde auf dem Rüttler mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach mehreren Waschvorgängen inkubiert die PVDF-Membran anschließend mit dem Sekundärantikörper. Die Membran wird wieder mehrfach gewaschen und zum Schluß mit den ECL-plus-Reagenzien inkubiert. Die Membran wird dann in transparente Folie eingewickelt und einem Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeit beträgt je nach Antikörper 5-30 min.

6 STATISTIK

Es handelt sich um eine explorative Datenanalyse, die zur Generierung neuer Hypothesen dient. Daher kann im Rahmen der Ergebnisdarstellung nicht von Signifikanzen, sondern lediglich von Tendenzen gesprochen werden. Bei symmetrischer Verteilung der Ergebnisse wurde der arithmetische Mittelwert der Stichprobe bestimmt. Zur Orientierung dient die Standardabweichung im Intervall -2s bis +2s.

Der Einsatz anderer explorativer statistischer Testverfahren erschien angesichts der geringen Stichprobenumfangs nicht angemessen.

V Ergebnisse

1 CHARAKTERISIERUNG DER AML ZELLEN

1.1 Expression von Oberflächenmarkern

Um die Interaktion zwischen Lymphozyten und Tumorzellen näher beleuchten zu können, müssen die Tumorzellen zunächst phäno- und genotypisiert werden. Dazu wurden in vorliegender Arbeit die AML Zellen verschiedener Patienten mit verschiedenen FAB Klassifikationen und Karyotypen untersucht (Tab.4).

Patient	Alter	Geschlecht	FAB-Klassifikation	chrom. Aberration	Ursprung
1	45	w	M4eo	Inv(16) p13q22	PB
2	59	w	M4eo	Inv(16) p13q22	KM
3	22	m	M4eo	Inv(16) p13q22	KM
4	48	w	M4eo	Inv(16) p13q22	PB
5	46	w	M4	normal	KM
6	47	w	M4	normal	KM
7	51	m	M4	normal	PB
8	37	m	M4	normal	PB
9	30	w	M2	normal	PB
10	35	w	M2	normal	PB
11	39	w	M2	komplex	PB
12	47	m	M1	Pentasomy (13)	KM
13	39	w	M1	Add(15)q26	PB
14	30	m	M5	Ins (10;11)	PB
15	55	m	M5	komplex	KM
16	33	w	M5	Trisomy(8)	KM

Tab.4: Charakteristika der Patienten; PB=peripheres Blut; KM=Knochenmark

Die zytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker erfolgte jeweils nach Entnahme der Blasten aus dem Knochenmark/Blut und nach einer Kultivierungsperiode von vier Wochen. Die AML Blasten dazu wurden in Kulturmedium kultiviert ohne den Zusatz von Zytokinen. Auf diese Weise ließen sich Zelllinien der verschiedenen Patienten generieren.

Die AML Zellen wurden auf die Oberflächenmarker CD13 und CD33 als typische Marker für die Vorläufer der myeloischen Zellreihe untersucht. Bei den frisch isolierten Blasten konnte bei 11 von 16 Patienten eine starke Expression dieser Vorläufermarker nachgewiesen werden, die hingegen nach einer Kultivierungsperiode von 4 Wochen nicht mehr nachweisbar waren. Es konnte eine Expression von 50-80% bei den frisch isolierten Blasten, aber von nur 0-10% bei den kultivierten Zelllinien beobachtet werden (Abb. 6a+b).

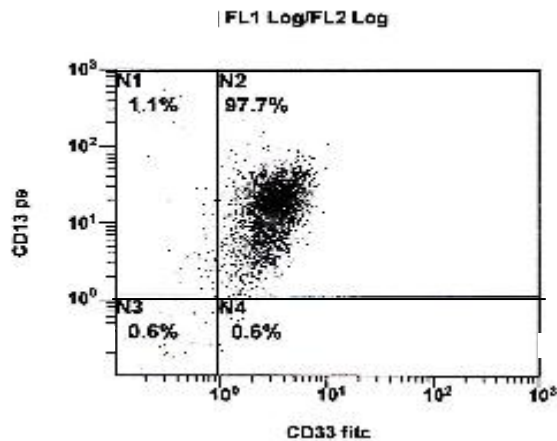


Abb.6a: frische AML Blasten

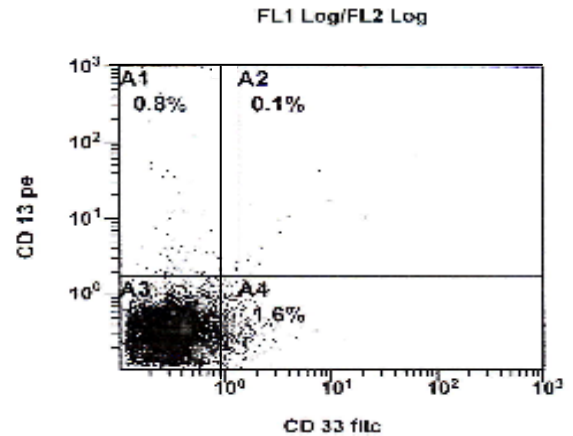


Abb.6b: 4 Wochen kultivierte AML Blasten

Auch die Expression des Monozytenmarkers CD14 sank während der in vitro Kultivierung von 50% an Tag 0 auf 0-10% an Tag 28.

Die Blasten wurden ebenfalls auf das Vorhandensein von kostimulatorischen Molekülen untersucht. LFA1 (CD11a) war an Tag 0 bei 15/16 Patienten <10% exprimiert. Die Expression stieg bis Tag 28 auf bis zu 50-80% stark an.

Ähnlich verhielt es sich mit den Markern für B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Beide Marker wurden bei frischen Blasten durchschnittlich weniger als zu 30% exprimiert. An Tag 28 stieg die Expression auf durchschnittlich 50-80% signifikant an (Abb.7a+b)

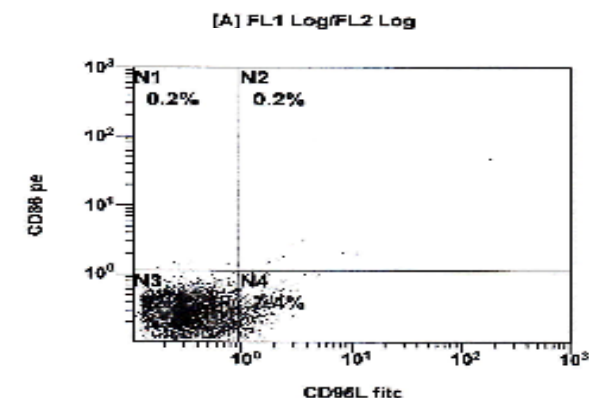
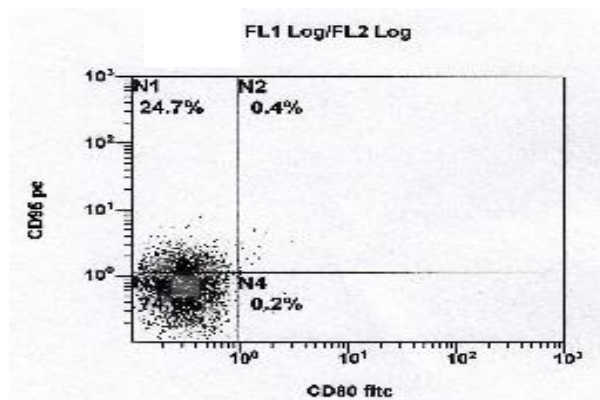


Abb.7a: frische AML Blasten

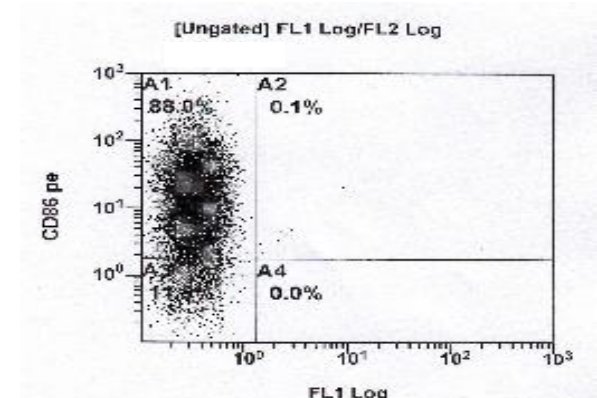
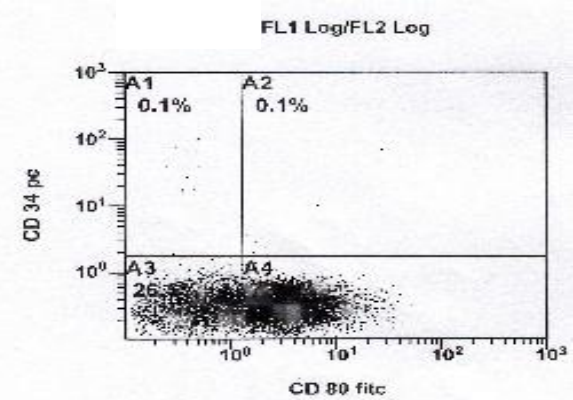


Abb.7b: 4 Wochen kultivierte AML Blasten

Für LFA3 (CD58) konnte sowohl bei den frisch isolierten Blasten als auch bei den kultivierten Blasten eine starke Expression nachgewiesen werden.
Die Oberflächenmarker CD1a und CD209 konnten während des gesamten Zeitraums nicht nachgewiesen werden (Abb.8).

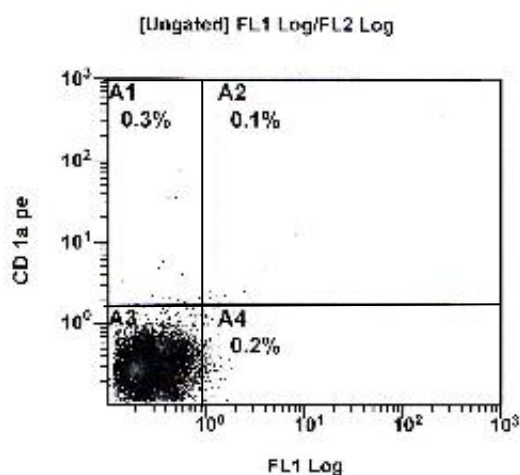


Abb.8: CD1a Expression auf kultivierten AML Blasten

Zellen blieben auch während dieser Zeit negativ für CD19 als B Zell Marker.
Diese Veränderung des Expressionsmusters der Oberflächenmarker korrelierte nicht mit den einzelnen FAB Klassifikationen oder Karyotypen.
Zum Vergleich wurden auch T-Lymphozyten mit monoklonalen Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen (Tab. 5a+b).

Patient	CD13	CD33	LFA1	CD11c	LFA3	CD1a	CD14	CD80	CD86	CD83	CD209
(a)											
1	++	++	+	+	+++	-	+++	-	-	+	-
2	-	-	-	-	+++	-	+++	-	++	+	-
3	++++	+++	++	++	++++	-	+++	-	-	+	-
4	++	++	+	++	+++	-	++	-	-	+	-
5	+++	+++	+	-	++++	-	++	-	+	+	-
6	-	-	-	-	+++	-	+++	+	+	++	-
7	+++	-	+	-	+++	-	++	-	++	+	-
8	+++	+++	+	+++	++++	-	+++	-	-	+	-
9	+++	-	-	-	+++	-	-	++	+++	++	-
10	+++	+	+	+++	+++	-	+	-	-	+	-
11	-	+	+	+	+++	-	-	-	-	+	-
12	+	+	+	+++	++++	-	-	-	-	+	-
13	++	+	+	+	+++	-	++	-	+	+	-
14	++	+	-	++	+++	-	+++	-	+	+	-
15	+++	+++	-	++	+++	-	++	-	-	+	-
16	-	-	+	-	+++	-	++	-	+	+	-
(b)											
1	-	-	+++	-	+++	-	-	+	++	+++	-
2	-	-	+++	+	+++	-	-	++	+++	+++	-
3	-	-	+++	-	++++	-	-	++++	++++	++	-
4	-	-	++	-	+++	-	-	++	++	+++	-
5	+++	+++	++	+++	++++	-	-	+++	+++	+++	-
6	-	-	+++	-	+++	-	-	++	++	++	-
7	-	-	++	-	+++	-	-	++	+++	+++	-
8	-	-	++	-	++++	-	-	+	++	++	-
9	-	-	++	-	+++	-	-	+++	++	+++	-
10	-	-	++	-	+++	-	-	++	++	+++	-
11	-	-	+++	-	+++	-	-	-	+	+++	-
12	-	-	+++	-	++++	-	+	-	-	++	-
13	-	-	+	-	+++	-	-	++	+++	++	-
14	-	-	++	+	+++	-	-	++	++	++	-
15	++	++	+	+	+++	-	-	++	++	++	-
16	-	-	++	+	+++	-	-	+++	+++	+++	-

Tab.5a+b: Expression der Oberflächenmarker der AML Blasten an Tag 0 (a) und Tag 28 (b) der in vitro Kultivierung; - 0-10%;+ 10-30%; ++ 30-50%, +++ 50-80%; +++++>80%

1.2 Morphologie

Makroskopisch fiel auf, dass die Tumorblasten im Verlauf der Kultivierungsperiode ein adhärentes Wachstumsverhalten aufwiesen. Sie wuchsen sowohl adhärent am Boden der Kulturflaschen als auch untereinander in Formation ähnlich einer Traube.

Daher wurde untersucht, ob das veränderte Expressionsmuster der Oberflächenmarker und adhärente Wachstumsverhalten mit einer Veränderung der Zellmorphologie einhergehen könnte. Dazu wurden Ausstrichpräparate angefertigt. Es wurde die Morphologie von den frisch isolierten Blasten mit den zugehörigen kultivierten Blasten verglichen. Die morphologischen Kriterien waren dabei im wesentlichen Zellgröße, Kernform und -lage, Struktur des Kernchromatins, Vorkommen und Größe der Nukleolen, Breite und Färbung des Zytoplasmas und das Vorkommen intrazytoplasmatischer Organellen.

Mikroskopisch konnten anhand der oben genannten morphologischen Merkmale zwischen frischen und kultivierten AML Blasten keine Unterschiede festgestellt werden, allerdings zeigten die kultivierten Blasten ansatzweise die Ausbildung dendritischer Zellfortsätze.

1.3 Zytochemische Untersuchungen

Zytochemische Untersuchungen sind zur Klassifikation der Leukämien sehr hilfreich. Sie werden in die FAB- und in die WHO-Klassifikation einbezogen.

Esterase-Reaktion: Esterase-positiv sind vor allem Monozyten und Makrophagen.

Peroxidase-Reaktion: Peroxidase-positiv sind Zellen der Granulopoese mit Ausnahme des Myeloblast I. Auch die Monozyten können schwach peroxidase-positiv sein.

Es wurden jeweils die Ausstrichpräparate von frisch isolierten und kultivierten Blasten in Bezug auf ihre Peroxidase- und Esterase Reaktion verglichen.

Die frischen Blasten der AML mit dem Karyotyp M4eo zeigten im Vergleich zu den frischen Blasten anderen Karyotyps eine starke Peroxidase Reaktion zwischen 60-80%. Bei den kultivierten Zellen hingegen war unabhängig vom Karyotyp die Peroxidase-Reaktion kaum noch nachweisbar (Abb.9a).

Die Esterase Reaktion war bei frisch isolierten und kultivierten Zellen zu gleichen Anteilen nachzuweisen (Abb.9b).

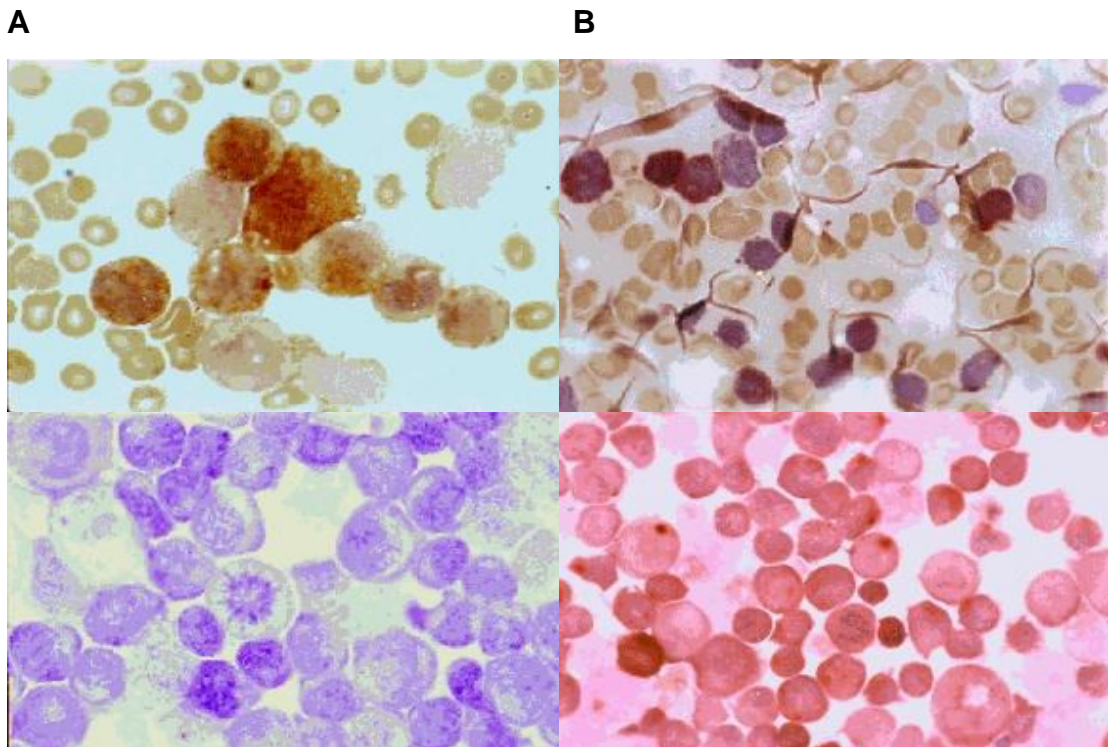


Abb. 9:

(A) Positive Peroxidase Reaktion frischer AML Blasten (oben), negative Peroxidase Reaktion kultivierter AML Blasten (unten)

(B) Positive Esterase Reaktion frischer AML Blasten (oben), positive Esterase Reaktion kultivierter AML Blasten (unten)

1.4 Western blot

Weiterhin wurde untersucht, ob die kultivierten Zellen der M4eo ihren Genotyp der inv(16) beibehielten. Zum Nachweis des der inv(16) zugrundeliegenden CBF-MYH11 (70 kDa) Fusionsgens wurde die Western Blotting Methode verwendet, ein Verfahren zum differentiellen Nachweis von Proteinenbänden nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Membranen. Sowohl die frisch isolierten als auch die kultivierten Tumorblasten wiesen dieses Fusionsgen mit den dafür typischen Proteinbänden in gleichem Maße auf (Abb.10).

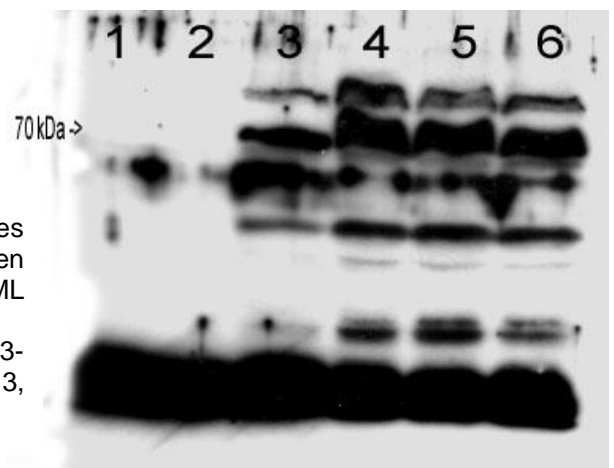


Abb.10: Nachweis des 70kDa Fusionsproduktes CBF β /MYH11 mittels Western blot Technik in den Banden 3-6 in Zellysaten von inv(16) positiven AML Blasten

Bande 1-Patient 6, Bande 2-Patient 10, Bande 3-Patient 1, Bande 4-Patient 2, Bande 5 -Patient 3, Bande 6-Patient 4

2 STIMULATION VON T-LYMPHOZYTEN DURCH KULTIVIERTE AML ZELLEN

2.1 Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob von AML Blasten in der Lage sind, T-Lymphozyten zu stimulieren. Dazu wurden T-Lymphozyten mit AML Blasten der verschiedenen Karyotypen kokultiviert (Mixed Tumor Lymphocyte Reaction = MTuLR).

Um den beeinflussenden Faktor Proliferation der Tumorzellen funktionell reduzieren zu können, wurden die verschiedenen AML Zellen zuvor mit 90 Gy bestrahlt.

Die Versuchsansätze wurden auch mit nicht bestrahlten Blasten durchgeführt, allerdings wurde hier die Auswertung der Ergebnisse durch die starke Proliferation der AML Blasten wesentlich beeinflusst.

Die MTuLR wurden an Tag 0, 3, 7, und 11 am Durchflusszytometer gemessen. Die T-Lymphozyten wurden auf ihren Phänotyp untersucht, und das Verhältnis von naiven zu stimulierten/aktivierten T-Lymphozyten erhoben. Die Quantifizierung erfolgte durch die Gegenüberstellung zu einer Standardzellpopulation mit genau definierter Zellzahl, die den Kulturen vor der Messung hinzugegeben wurde, die Proliferationsaktivität wurde durch die messbare Inkorporation von ^3H -Tdr in die replizierende DNA dargestellt. Als Kontrollen dienten sowohl T-Lymphozyten und Tumor Zellen alleine als auch Epstein Barr virus transformed B Lymphoblastoid cell lines (EBV-LCL).

Zum einen wurde die Stimulation von allogenen T-Lymphozyten durch inv(16) positive und negative AML Blasten bzw. durch PBMCs von gesunden Spendern untersucht und zum anderen die Stimulation von autologen T-Lymphozyten durch AML Blasten von inv(16) AML Blasten.

2.2 MTuLR mit allogenen T-Lymphozyten

Anhand der durchflusszytometrischen und quantifizierenden Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die inv(16) positiven und negativen AML Blasten die allogenen T-Lymphozyten von gesunden Spendern stark stimulierten und an Tag 3 zu einer 3-3,5fachen Expansion der gesamten CD3+ allogenen T-Lymphozyten führte. Bei der MTuLR mit inv(16) negativen Blasten war zu beobachten, dass die Zellzahl an Tag 7 etwas zurück ging und an Tag 11 noch das 2fache betrug bezogen auf die Menge CD3+ T-Lymphozyten an Tag 0. Die MTuLR mit AML Blasten von inv(16) positiven Patienten zeigte, dass der Anteil der CD3+T-Lymphozyten zwar an Tag 7 etwas zurückging, aber an Tag 11 wieder anstieg und zu einer Expansion bis auf das 4fache bezogen auf Tag 0 anstieg. Eine leichte Expansion der T-Lymphozyten zeigte

sich auch bei der MTuLR mit frischen Blasten von inv(16) positiven AML Blasten, die aber nicht annähernd so deutlich war wie durch kultivierte Zellen, die eine höhere Expressierung von konstimulatorischen Molekülen (wie B7.1 und B7.2) aufwiesen (Abb.11a, 15a+b).

2.3 MTuLR mit autologen T-Lymphozyten

Der Versuch der autologen Stimulation von T-Lymphozyten inv(16) negativen AML Blasten zeigte eine kaum messbare Expansion der CD3+ T-Lymphozyten, die sich auch am Tag 7 nahezu konstant hielt. An Tag 11 waren nur noch 75% der Zellen messbar als ursprünglich an Tag 0 eingesetzt worden waren. Die Mikroskopie unter Anfärbung mit Trypanblau zeigte, daß viele Zellen abgestorben waren.

Im autologen Stimulationsversuch mit inv(16) positiven Blasten hingegen konnte an Tag 3 eine Zunahme der T-Lymphozyten Zahl um das 2,5fache zur ursprünglich eingesetzten T-Lymphozyten Menge festgestellt werden. An Tag 7 konnte nochmals eine leichte Expansion auf das 3fache zu Tag 0, und an Tag 11 konnte eine T-Lymphozyten Expansion auf mehr als das 5fache zur Ausgangskonzentration im autologen System gemessen werden.

Durch frische AML Blasten konnten im Gegensatz zu kultivierten AML Blasten nur wenig Stimulation und Proliferation der T-Lymphozyten induziert werden (Abb.11b, 15c+d).

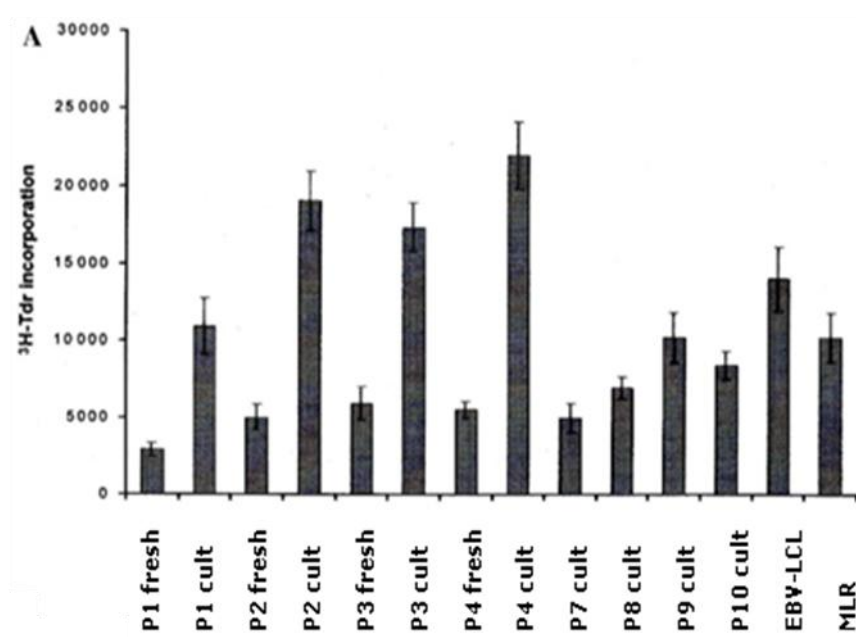


Abb.11a: Inkorporation von ³H-Tdr zum Vergleich der Stimulationsfähigkeit sowohl frischer als auch kultivierter AML Blasten mit inv(16) (Patienten 1-4) und ohne Inv(16) (Patienten 7-10) im allogenen Versuchsansatz

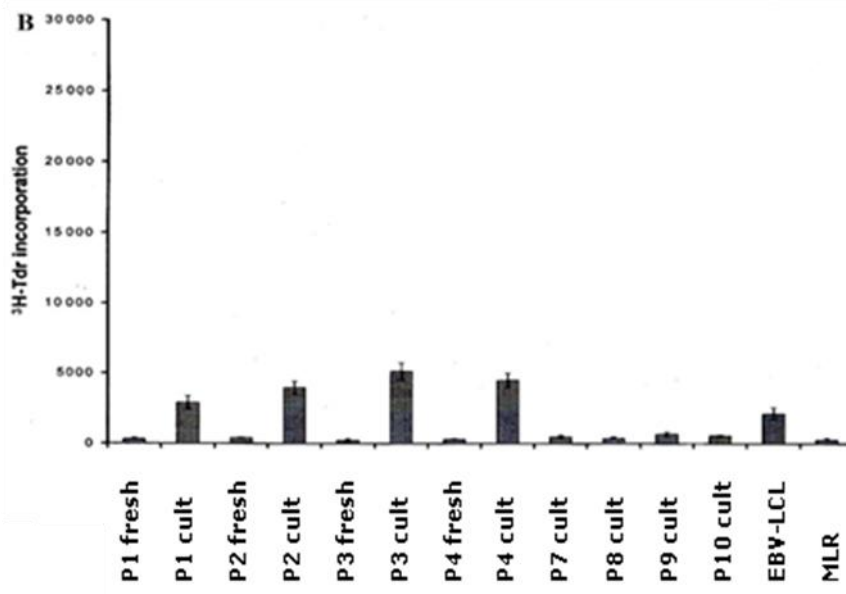


Abb.11b: Inkorporation von ³H-Tdr zum Vergleich der Stimulationsfähigkeit sowohl frischer als auch kultivierter AML Blasten mit inv(16) (Patienten 1-4) und ohne inv(16) (Patienten 7-10) im autologen Versuchsansatz

2.4 Anhalten der Aktivierung

Die Aktivierung konnte durch repetitive Zugabe von AML Blasten und rekombinantem IL-2 bis zu 192 Stunden aufrechterhalten werden. Dies wurde durch durchflusszytometrische Untersuchungen und Expansionsfähigkeit der T-Lymphozyten bestätigt (Abb.15a-d).

2.5 Rolle kostimulatorische Moleküle (am Beispiel von B7.1, B7.2)

Der Versuchsansatz entsprach dem der vorherigen. Die MTuLR kultivierten sowohl im allogenen als auch im autologen System mit inv(16) positiven und negativen AML Blasten. Diese Blasten exprimierten auf ihrer Oberfläche nur sehr geringe Anteile von B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86).

Die Messungen ergaben an Tag 3 für das allogene System eine Expansion um das 2fache. Die Expansionsrate hielt sich bis Tag 7. An Tag 11 konnte ein Rückgang der CD3+ T- Lymphozyten verzeichnet werden. Die Stimulation schien nicht so suffizient wie in den Versuchen mit CD80 und CD86 stark exprimierenden Zellen.

Im autologen System zeigte sich an Tag 3 keine bis kaum Expansion sowohl in Gegenwart von inv(16) positiven als auch inv(16) negativen AML Blasten. Die insuffiziente Stimulation der T- Lymphozyten führt schließlich zum Zelluntergang, denn an Tag 7 waren nur noch wenige und Tag 11 kaum noch Zellen per Durchflusszytometrie messbar.

Zur weiteren Untersuchung der Zellvitalität wurden T-Lymphozyten an Tag 11 aus allogenen und autologen Versuchsansätzen sowohl durch inv(16) positive als auch

negative AML Blasten mit Trypan Blau angereichert. Die mikroskopische Untersuchung zeigte bei allen Versuchansätzen eine Aufnahme von Trypanblau in das Zellinnere der meisten T-Lymphozyten, was den Zelluntergang bestätigte.

3 PHÄNOTYP DER PROLIFERIERENDEN T-LYMPHOZYTEN

3.1 Allgemeines

Um neben der Größen- und Mengenzunahme (Abb.12) der T-Lymphozyten auch die Veränderung des Expressionsmusters der Oberflächenantigene zu erfassen, wurden in regelmäßigen Abständen durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Neben den T-Lymphozyten-Markern wurden auch Aktivierungsmarker und das Vorhandensein von kostimulatorischen Molekülen, sowie das Vorhandensein von B-Lymphozyten, NK-Zellen und Monozyten bestimmt.

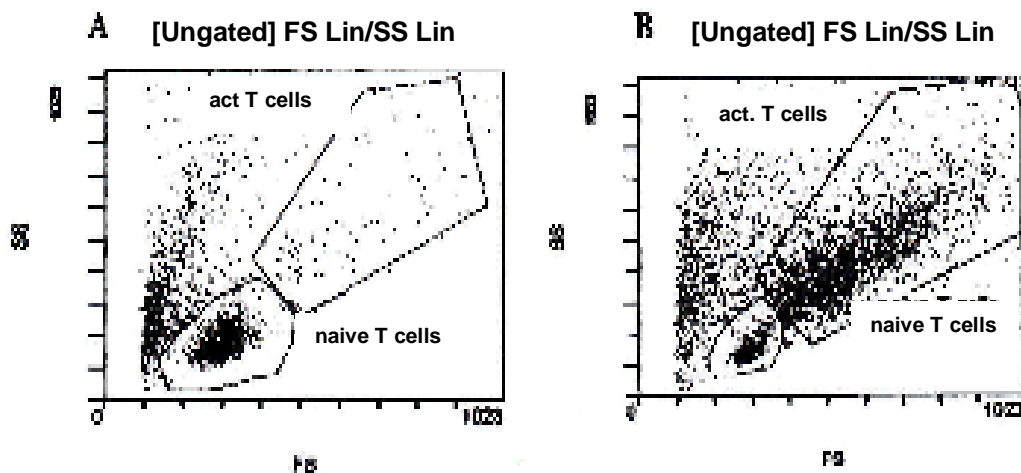


Abb.12: Größen- und Mengenzunahme der T-Lymphozyten durch die Aktivierung: (A) naiv, (B) aktiviert

3.2 Aktivierungsmarker

Als Aktivierungsmarker der T-Lymphozyten gelten CD25 und CD69. Es konnte beobachtet werden, dass im Falle der Stimulation diese Marker schon nach 24 Stunden nachweisbar waren. Beide erreichten ein Maximum nach circa 72 Stunden und wurden dann aber trotz anhaltender Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten wieder herabreguliert. Der Verlauf der Expression von CD25 und CD69 war ähnlich, CD25 wurde stärker exprimiert, so dass im Folgenden vereinfachend nur auf die Expression von CD25 eingegangen wird (Abb.13).

In der allogenen Stimulation konnte sowohl durch inv(16) positive als auch inv(16) negative AML Blasten eine T-Lymphozyten Proliferation an Tag 3 um das 3fache festgestellt werden. Der Anteil der CD25+ betrug dabei bei MTuLR mit inv(16)

negativen das 6,5fache bei der mit inv(16) positiven AML Blasten sogar das 8fache des Ausgangswertes an Tag 0. Die Expression von CD3 reduzierte sich bis auf das 2fache (inv(16) negativ), ähnlich wie der Anteil der CD25+ Zellen (2,5fache) des Ausgangswertes an Tag 0.

In der autologen MTuLR mit inv(16) negativen AML Blasten war kaum T-Lymphozytenproliferation zu beobachten, die Menge der CD3+ T-Lymphozyten blieb von Tag 0 bis Tag 7 annähernd konstant und nahm bis Tag 11 sogar noch weiter ab, mikroskopische Untersuchungen mit Trypanblau bestätigten den Zelluntergang. Dennoch war eine Aktivierung durch CD25 messbar, die aber aufgrund der fehlenden Proliferation der T-Lymphozyten vernachlässigbar erscheint. In der autologen MTuLR mit inv(16) positiven Blasten dagegen war eine deutliche Proliferation der CD3 T-Lymphozyten zu beobachten (Tag 3 auf das 2,5fache bis Tag 11 auf das 5fache). Der Anteil der CD25+ T-Lymphozyten proliferierte dabei an Tag 3 bis auf das 5fache, reduzierte sich dann aber bis an Tag 11 auf das 1,5fache des Ausgangswertes an Tag 0.

Nähere Untersuchungen ergaben, dass in den Stimulationsversuchen durch AML Blasten von Patienten mit inv(16) vor allem die CD25/CD8 doppelt positiven T-Lymphozyten expandierten. Besonders deutlich wurde das in den autologen Versuchsansätzen.

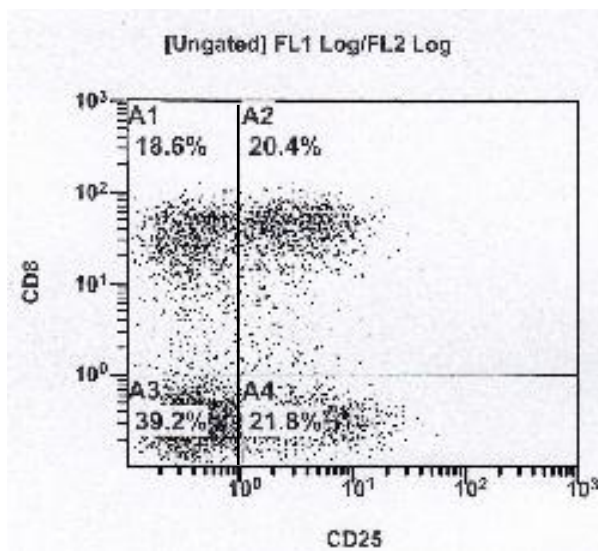


Abb.13: CD25/CD8 doppelt positive T-Lymphozyten-Population an Tag 7 der autologen Stimulation

Zu keinem Zeitpunkt konnten B-Lymphozyten oder Monozyten nachgewiesen werden

3.3 CD4 / CD8 Subpopulationen

Mit dem Durchflusszytometer wurden die Anzahl und Proliferationsaktivität der beiden Subpopulationen bestimmt (Abb.14a+b).

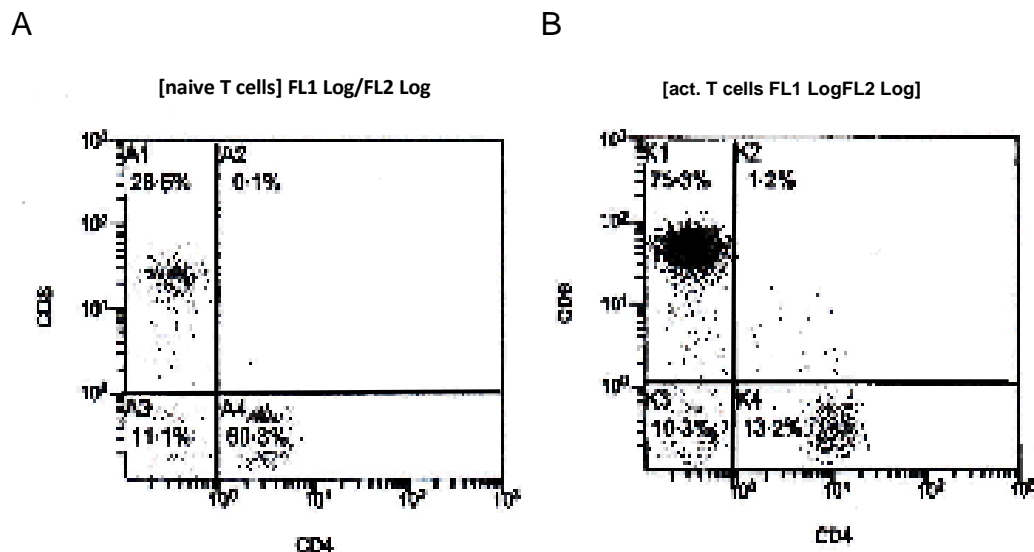


Abb.14a+b: Verhältnis CD4 zu CD8 bei naiven (A) und aktivierten (B) T-Lymphozyten

Im allogenen Versuchsansatz mit inv(16) negativen AML Blasten konnte gezeigt werden, dass die CD4+ T Zellen um das 3fache, die CD8+ um das 4fache an Tag 3 expandierten. Allerdings hielt diese Proliferationsaktivität nicht lange an, die Zellzahl ging bis Tag 11 wieder bis auf ihre Ausgangswerte zurück. Das Verhältnis von CD4 zu CD8 sank an Tag 7 von 2:1 auf 1,3:1, an Tag 11 betrug es ungefähr wieder 2:1 (Abb. 15b).

Im allogenen Versuchsansatz mit inv(16) positiven Blasten proliferierten die CD4+ T Zellen um das 2-3fache, wohingegen die CD8+ anfangs um das 4fache, bis Tag 11 sogar um das 7-8fache proliferierten. Das führte dazu, dass sich das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen von 2:1 zu Beginn der MTuLR umkehrte zu CD4/CD8 1:2 (Abb. 15a).

Ähnlich verhielt es sich auch im autologen Versuchsansatz. In der MTuLR mit inv(16) negativen AML Blasten war wie schon erwähnt nur wenig Proliferation messbar. Das Verhältnis von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten blieb von Beginn der MTuLR bis Tag 11 bei 2:1 (Abb. 15c).

In der autologen MTuLR mit AML Blasten von inv(16)positiven Patienten proliferierten die CD4+ T-Lymphozyten um das 2-3fache, die CD8+ Zellen an Tag 11 sogar um das 9fache. Das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ verschob sich dabei von 2:1 an Tag 0 zu 1:2 an Tag 11 (Abb.15d)

Spender+inv16

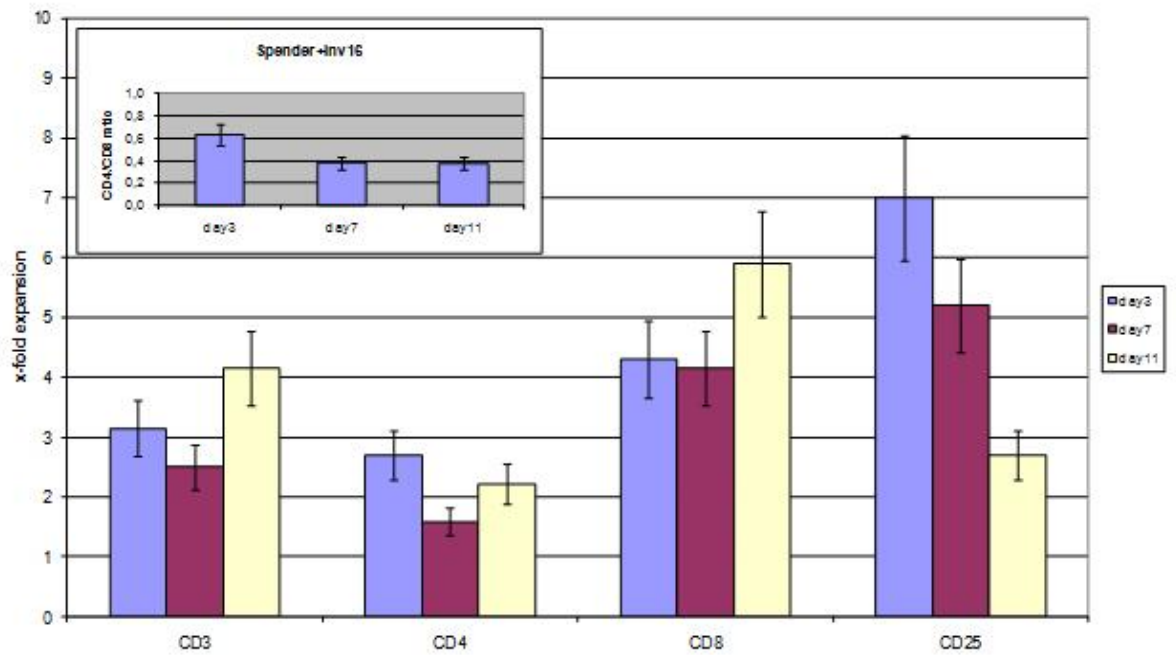


Abb.15a: allogene Stimulation von Spender T-Lymphozyten mit AML inv(16)

Spender+non inv16

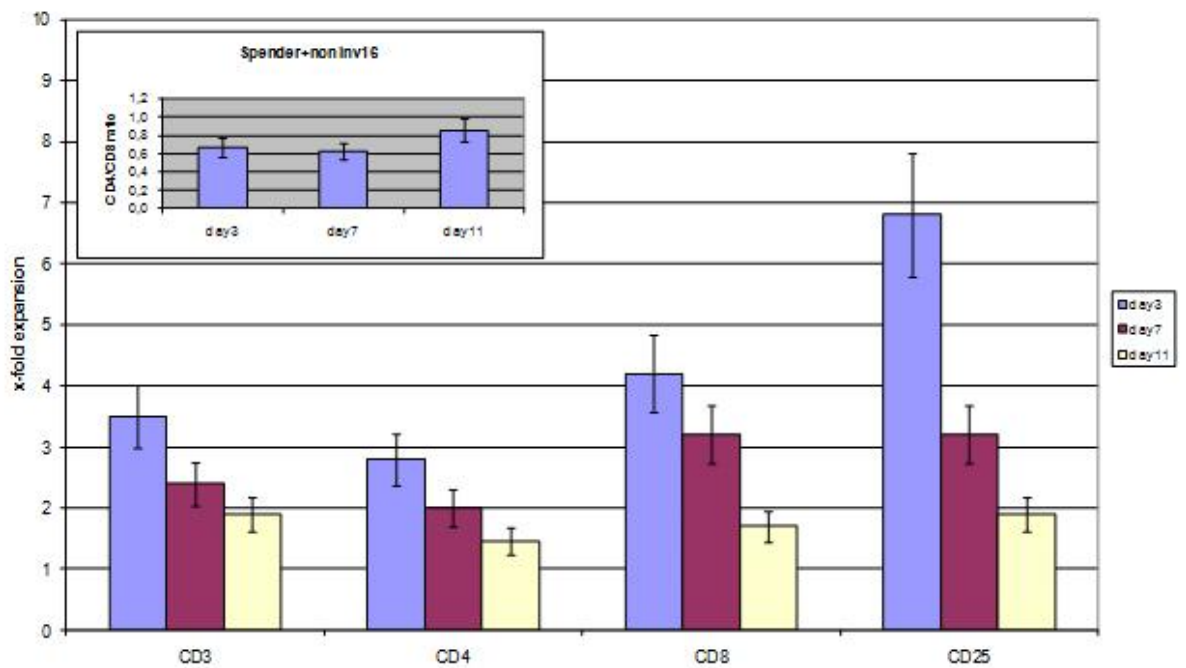


Abb.15b: allogene Stimulation von Spender T-Lymphozyten mit AML ohne inv(16)

autolog+non inv16

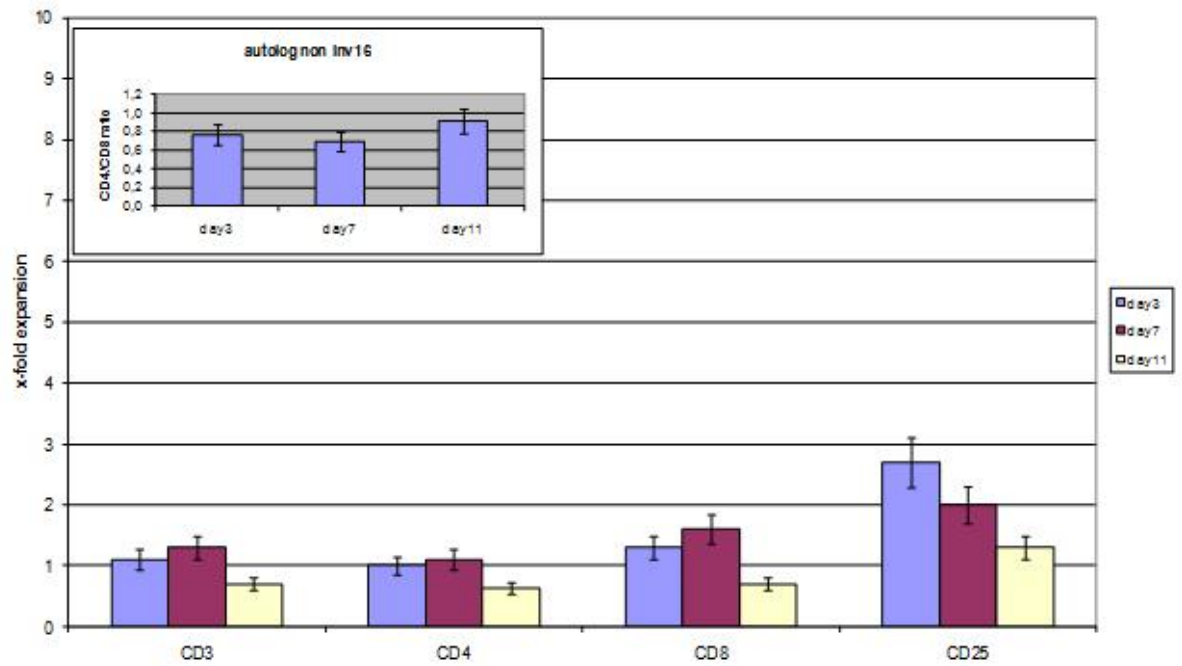


Abb.15c: autologe Stimulation von T-Lymphozyten mit AML ohne inv(16)

autolog+inv16

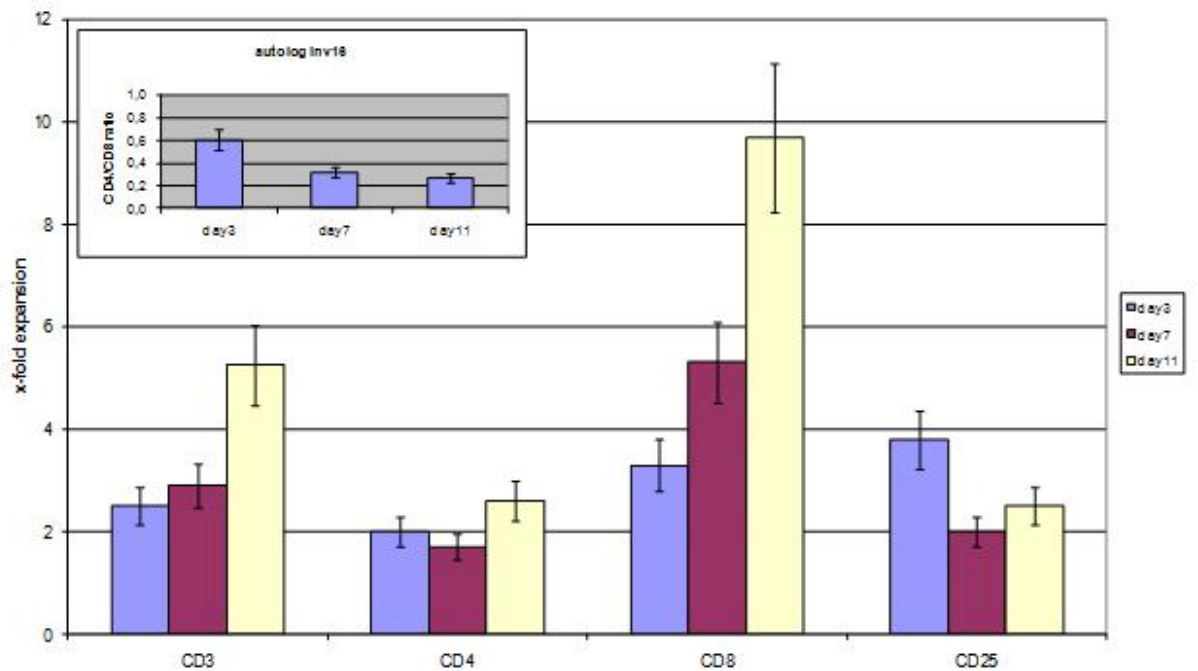


Abb.15d: autologe Stimulation von T-Lymphozyten mit AML inv(16)

3.4 Andere T-Lymphozyten Subpopulationen

An Tag 11 der autologen Stimulation mit AML Blasten mit inv(16) konnte eine CD45RO/CD8 doppelt positive Population mit einem Gesamtanteil von fast 30% festgestellt werden (das 20fache im Vergleich zum Anteil in naiven T-Lymphozyten) (Abb.16).

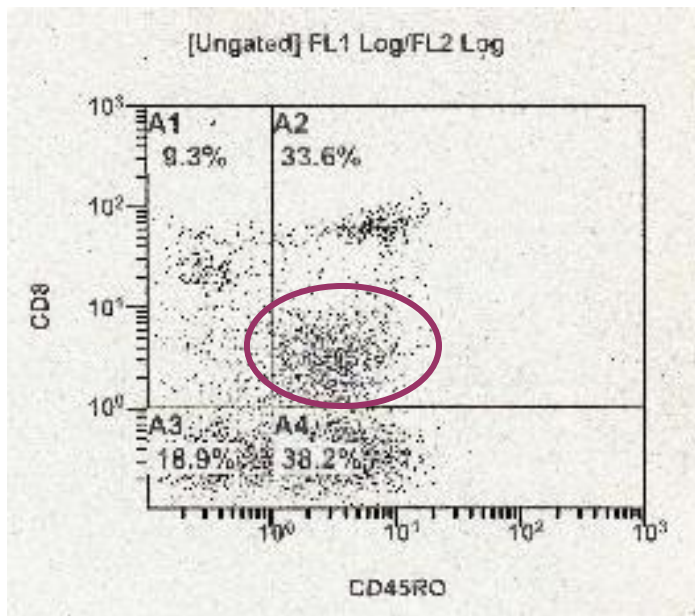


Abb.16: CD45RO/CD8 doppelt positive T-Lymphozyten-Population an Tag 11 der autologen Stimulation

3.5 Weitere akzessorische Moleküle

Weitere Untersuchungen sollten die zytotoxischen T-Lymphozyten näher charakterisieren.

Im autologen Stimulationsversuch mit inv(16) positiven AML Blasten zeigen die CD8 T-Lymphozyten eine deutliche Koexpression kostimulatorischer Rezeptoren wie CD27 und CD28. Ebenso zeigt sich eine deutliche Proliferation der CD3/CD11a doppelt positiven T-Lymphozyten (Abb.17c).

Die Daten des autologen Stimulationsversuches mit inv(16) negativen AML Blasten zeigen eine starke Proliferation von CD56 positiven Zellen, die Daten sollten aber aufgrund der äußerst geringen Zellzahl kritisch betrachtet werden (Abb.17d).

Die allogenen Stimulationsversuche zeigen sowohl durch inv(16) positive als auch negative AML Blasten eine anfänglich erhöhte Proliferation mit verstärkter Expression von Aktivierungsmarkern, die aber ab Tag 3 wieder regredient ist. Ebenso verhält es sich mit den kostimulatorischen/akzessorischen Molekülen CD11a/CD27/CD28 (Abb.17a+b).

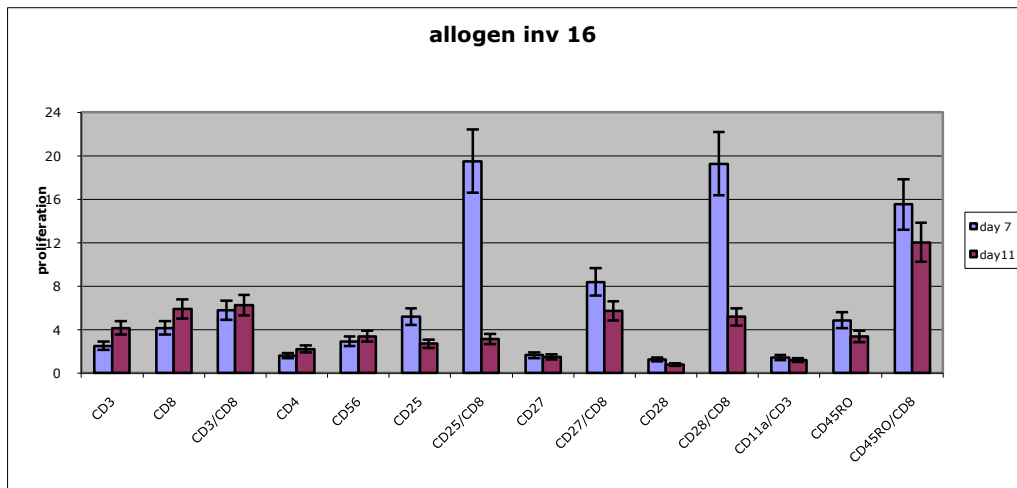


Abb.17a: Darstellung der CD8+-T-Lymphozyten Subpopulation und ihre Expression von kostimulatorischen/akzessorischen Molekülen nach allogener Stimulation mit AML mit inv(16)

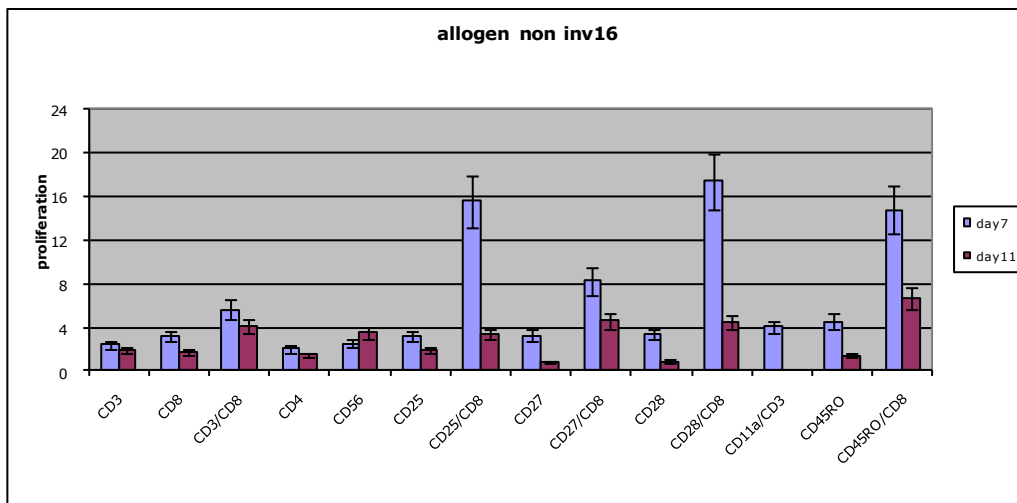


Abb.17b: Darstellung der CD8+-T-Lymphozyten Subpopulation und ihre Expression von kostimulatorischen/akzessorischen Molekülen nach allogener Stimulation mit AML ohne inv(16)

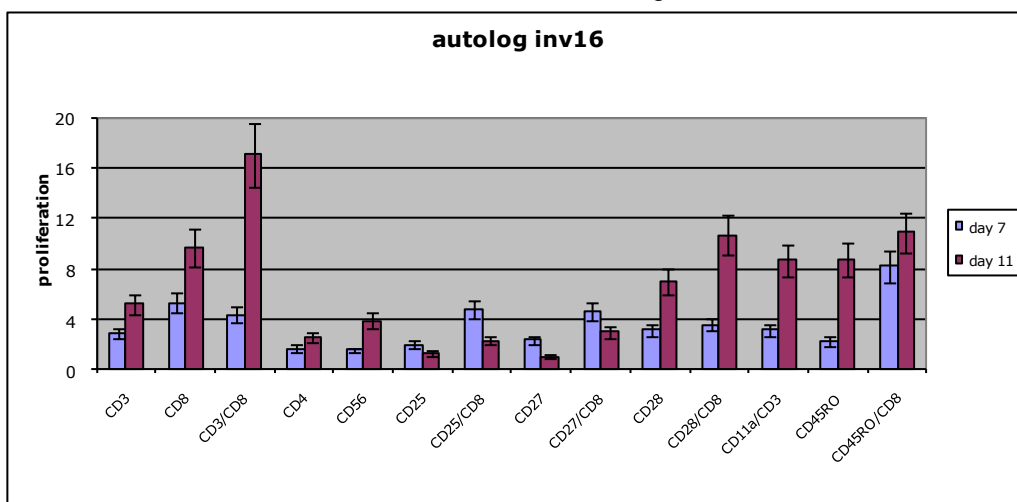


Abb.17c: Darstellung der CD8+-T-Lymphozyten Subpopulation und ihre Expression von kostimulatorischen/akzessorischen Molekülen nach autologer Stimulation mit AML mit inv(16)

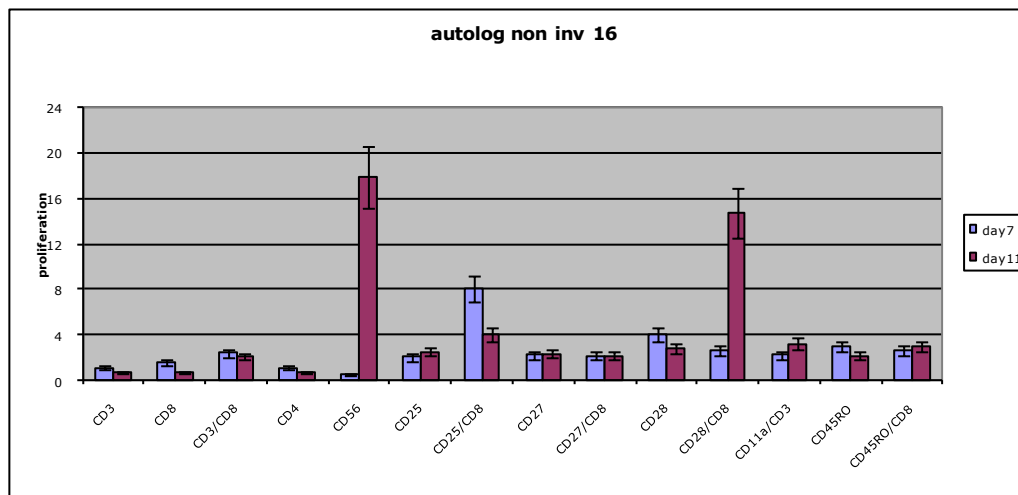


Abb.17d: Darstellung der CD8+-T-Lymphozyten Subpopulation und ihre Expression von kostimulatorischen/akzessorischen Molekülen nach autologer Stimulation mit AML ohne inv(16)

4 ZYTOTOXIZITÄT

4.1 Allgemeines

Zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität wurden die stimulierten T-Lymphozyten mittels eines CD3+/CD28+ Kits und den zuvor zur Stimulation eingesetzten AML Blasten expandiert .

Die expandierten T-Lymphozyten wurden dann mit verschiedenen Blasten kokultiviert: autologe AML Blasten mit denen die T-Lymphozyten im Vorversuch stimuliert wurden, allogene AML Blasten anderen Karyotyps, K562, SW480, allogene PBMCs und EBV-LCL. Der Anteil der lysierten Blasten wurde nach 4, 12, 18, 24 und 48 Stunden mittels Durchflußzytometrie evaluiert (Abb.18). Der größte Anteil an lysierten Blasten war nach 18 Stunden messbar. Zur Vereinfachung wird deshalb hier nur auf die Daten nach 18 Stunden eingegangen.

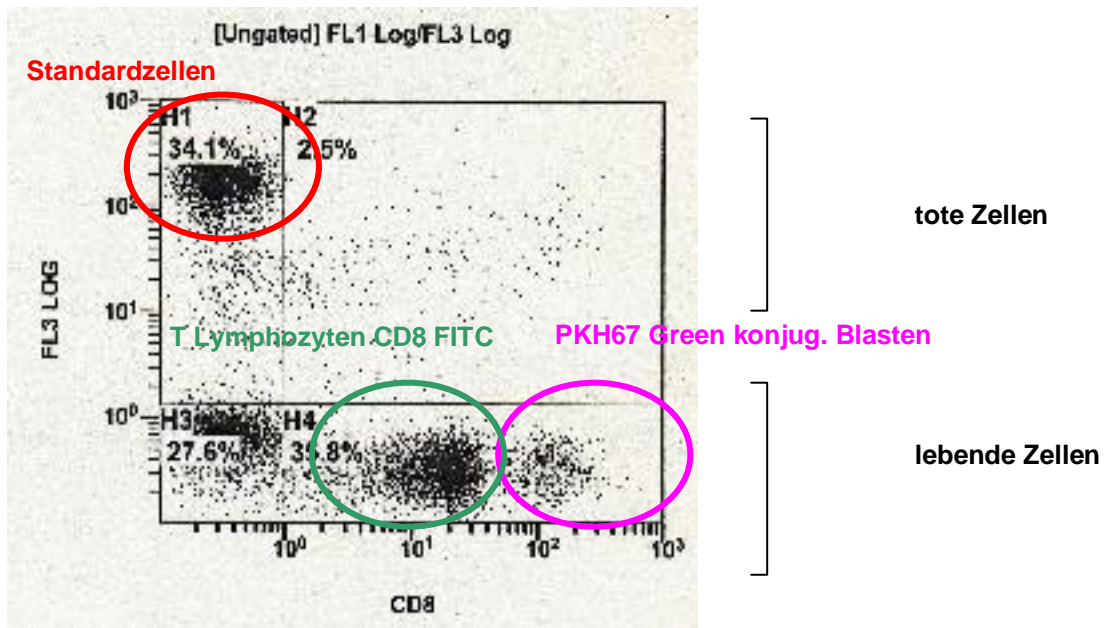


Abb.18: Darstellung der Durchflusszytometrie-Analyse eines Zytotoxizitätsversuches

4.2 Zytotoxizität durch inv(16) positive AML Blasten

Spender T-Lymphozyten wurden allogene durch inv(16) positive AML Blasten aktiviert, expandiert und dann im Lyseversuch eingesetzt. Die stärkste Lyseaktivität mit ca 62% zeigte sich gegenüber den inv(16) positiven AML Blasten, mit denen die T-Lymphozyten ursprünglich geprimt wurden. Inv(16) positive AML Blasten eines anderen Patienten wurde zu 52%, inv(16) negative AML Blasten wurden zu 48% lysiert, SW480 Blasten und EBV-LCL sogar nur zu 10%, K562 Blasten wurden zu 53%, allogene PBMCs zu 6% lysiert (Abb.19a).

Im autologen Versuchsansatz zeigten die durch autologe inv(16)positive AML Blasten aktivierten T-Lymphozyten eine Lyseaktivität von 50%. Allogene inv(16) positive AML Blasten HLA-matched werden zu 23%, inv(16) mismatched zu 10%, allogene PBMCs zu 12% lysiert. Die übrigen Lyseraten betrugen <10% (Abb.19b)

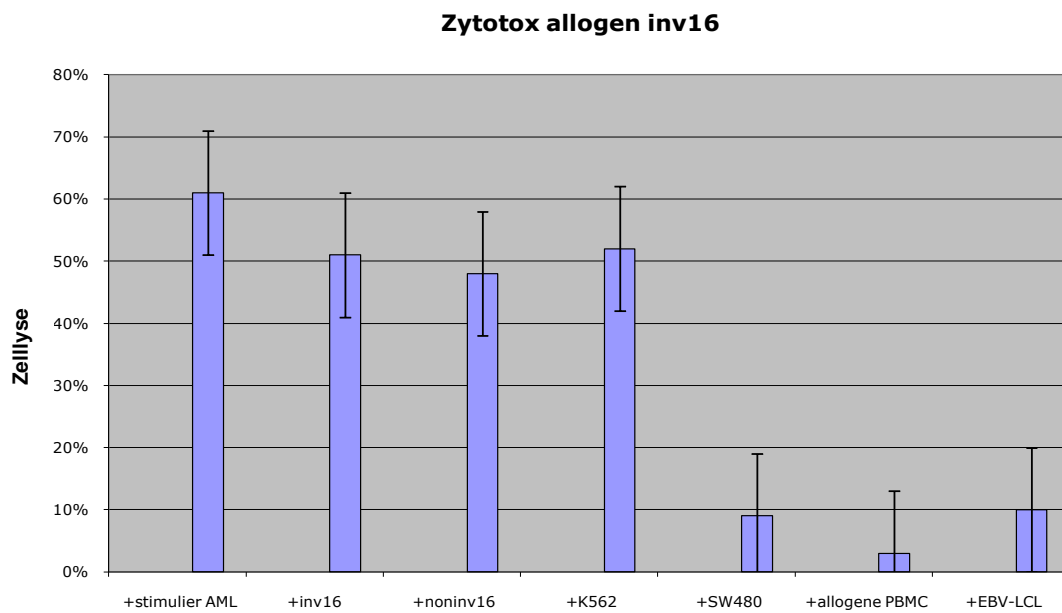


Abb.19a: Zytotoxizität allogen stimulierter T-Lymphozyten eines Patienten mit AML inv(16)

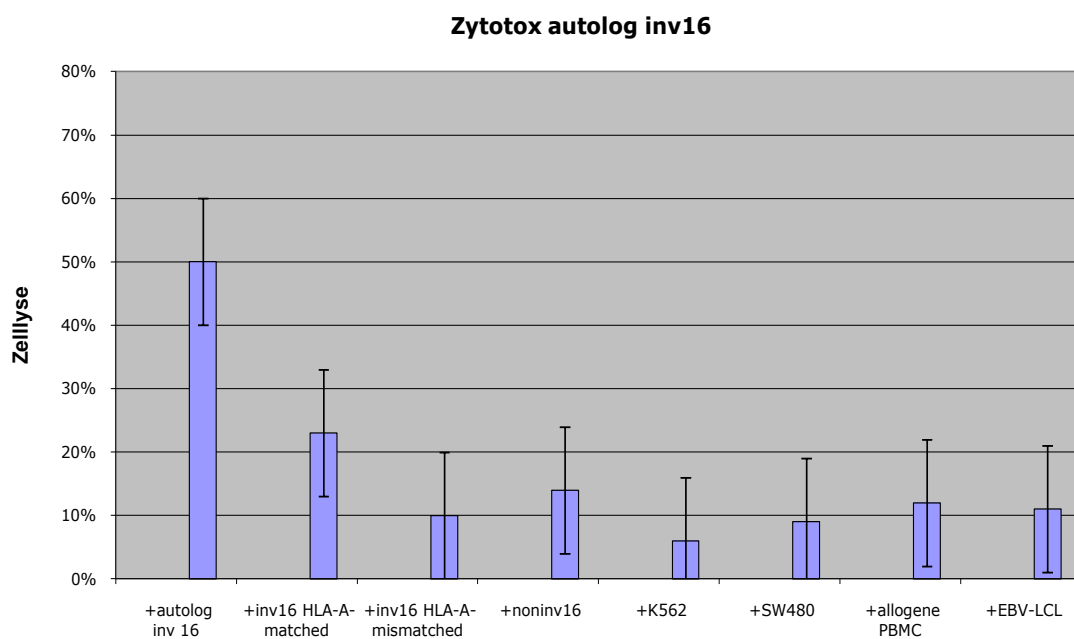


Abb.19b: Zytotoxizität autolog stimulierter T-Lymphozyten eines Patienten mit AML inv(16)

4.3 Zytotoxizität durch inv(16) negative AML Blasten

Die T-Lymphozyten wurden allogen mit inv(16) negativen AML Blasten aktiviert, expandiert und auf ihr Lyseverhalten untersucht.

Die AML Blasten, mit denen die T-Lymphozyten zuvor stimuliert worden waren, wurden zu 46% lysiert, allogene inv(16) negative AML Blasten eines anderen

Patienten zu 48%, inv(16) positive AML Blasten wurden zu 36%, K562 zu 43% lysiert. Die übrigen Lyseaktivitäten blieben < 15% (Abb.19c).

Der autologe Zytotoxizitätsversuch mit T-Lymphozyten eines Patienten mit AML inv(16) negativen Blasten konnte nicht durchgeführt werden, da sich auf diese Weise keine T-Lymphozyten aktivieren liessen.

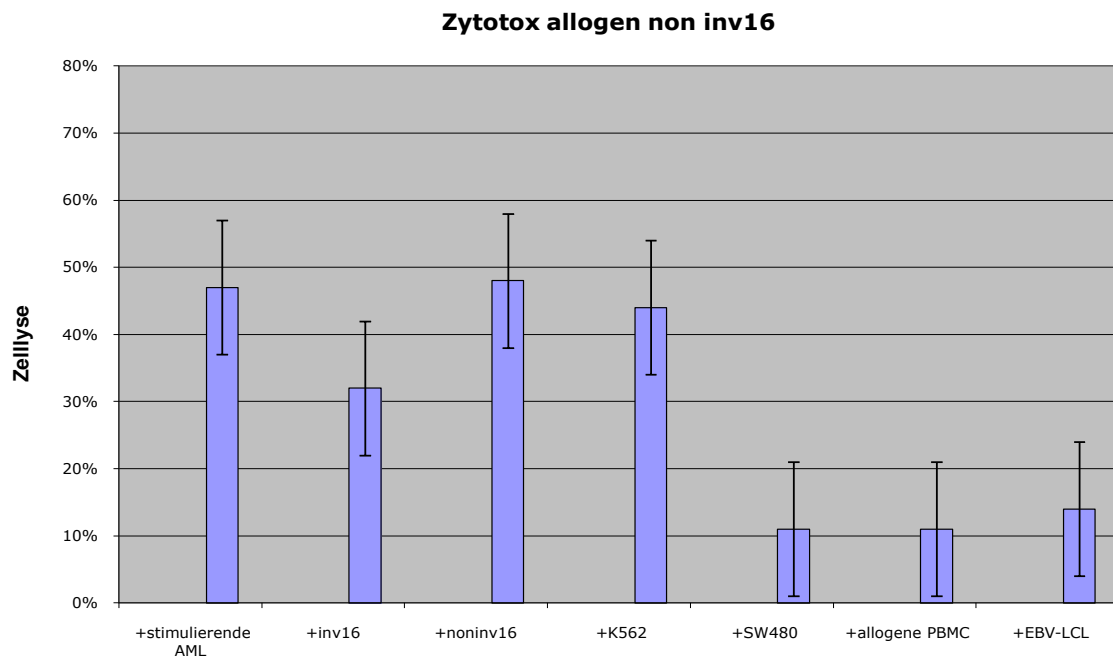


Abb.19c: Zytotoxizität allogen stimulierter T-Lymphozyten eines Patienten mit AML ohne inv(16)

4.4 Blockversuch

Um die zytotoxischen Reaktion im autologen Versuchsansatz mit AML inv(16) positiven Blasten weiter zu charakterisieren, wurden weitere Zytotoxizitätsversuche durchgeführt. Die zytotoxischen T-Lymphozyten stammten aus einem autologen und allogenen Stimulationsansatz mit inv(16) positiven AML Blasten. Die AML Blasten wurden vor dem Versuch mit Antikörper entweder gegen Moleküle von MHC-Klasse-I oder -II, in einem weiteren Versuch die T-Lymphozyten anti-CD4 bzw. anti-CD8 inkubiert, als Kontrollmessung diente eine Vorinkubation der jeweiligen Zellen mit einem unspezifischen Antikörper (Kontrolle).

Die Ergebnisse zeigten, dass es durch die vorherige Inkubation mit Antikörpern gegen Moleküle der MHC-Klasse-I bzw. anti-CD8 zu einem starken Abfall der zytotoxischen Aktivität auf unter 10% kommt. Die vorherige Inkubation mit Antikörper gegen Moleküle von MHC-Klasse-II bzw. anti-CD4 hingegen senkten die zytotoxische

Aktivität nur um ca. 10 %. Eine vorherige Inkubation mit unspezifischen Antikörpern wie zum Beispiel IgG2b zeigte keine signifikante Beeinflussung der Lyseaktivität (Abb.20).

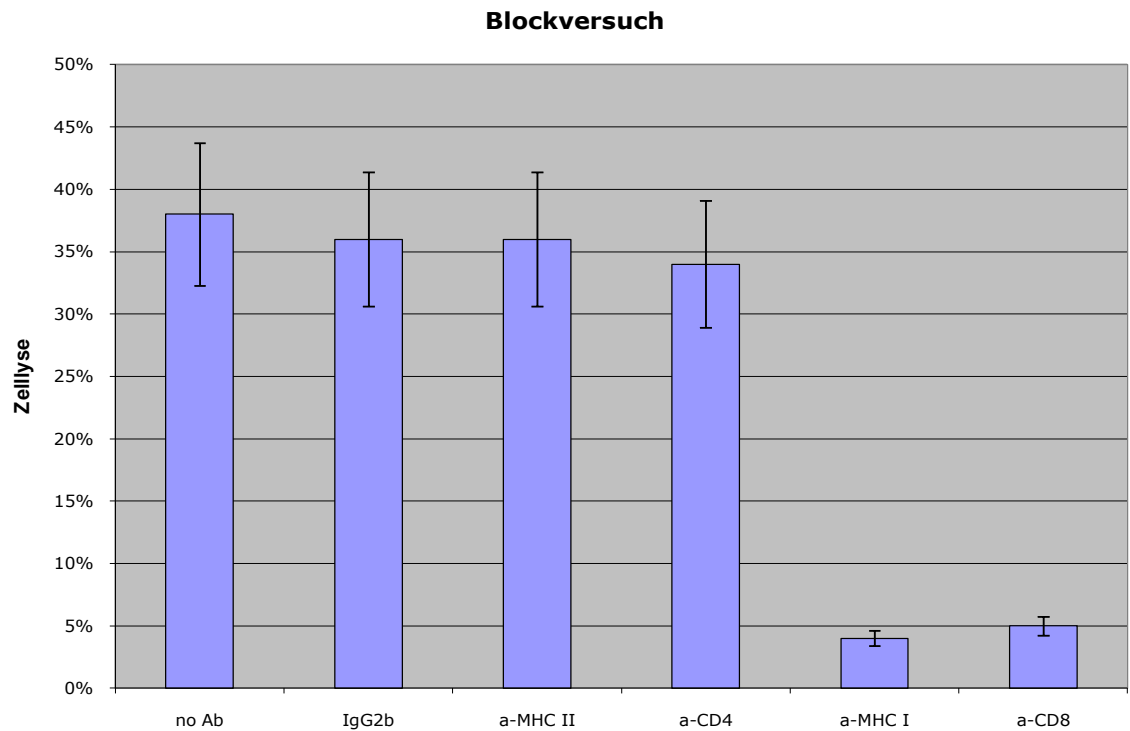


Abb.20: Charakterisierung der zytotoxischen Reaktion

VI DISKUSSION

1 ALLGEMEINES

Die AML ist trotz vieler Fortschritte in der Behandlung weiterhin eine lebensbedrohliche Erkrankung. Trotz interdisziplinärer Ansätze und Ausreizung klassischer Therapiemodalitäten gehört sie als maligne Erkrankung zu den führenden Todesursachen. Chemotherapie kann zumeist die Tumorlast reduzieren und führt oftmals zu einer kompletten Remission, dennoch ist es von großer Bedeutung, nach weiteren Behandlungsansätzen zu suchen, da ein hoher Prozentsatz der Patienten mit einer AML in kompletter Remission ein Rezidiv erleiden.

Neuere therapeutische Konzepte haben die Zielsetzung, das patienteneigene Immunsystem durch spezifische immuntherapeutische Maßnahmen in das therapeutische Gesamtkonzept mit einzubeziehen (Burnett et al. 1997; Tallman et al. 2005; King et al. 2007). Erste Hinweise dafür, dass menschliche Tumore von dem eigenen Immunsystem erkannt werden, kamen unter anderem von Studien von Old et al., die bei Patienten zirkulierende Antikörper und malignomreaktive T-Lymphozyten fanden (Old et al 1963; Knuth et al. 1984).

2 CHARAKTERISIERUNG DER AML ZELLEN

Eine Voraussetzung für das Entstehen einer immunologischen tumorinduzierten Reaktion ist die Erkennung von tumorspezifischen oder tumorassoziierten Antigenen bzw. Epitopen durch das Immunsystem des Patienten (Boon et al 1997; Sahin et al 1999). Das Vorhandensein von fusionierten oder mutierten Proteinen bietet eine molekulare Basis für die Expression von leukämiespezifischen Peptid-Sequenzen. Die Fusionsgene können an der Fusionsstelle neue Aminosäuresequenzen enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine differente Aminosäure in der Gensubstanz einer Zelle ausreicht, um eine potentiell antigene tumorassoziierte Determinante zu schaffen (Healy et al.1991). In den letzten Jahren wurden stetig neue tumorassoziierte Epitope für verschiedenste Tumore wie das maligne Melanom, das Nierenzellkarzinom und andere definiert, so auch für das Fusionsgen BCR/ABL der chronisch myeloischen Leukämie oder PML/RAR α der akuten promyelozytären Leukämie (Gambacorti-Passerini et al. 1993; Clark et al. 2001).

Durch diese Peptidsequenzen kann eine signifikante Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten induziert werden (Gambacorti -Passerini et al.1993; Geary et al. 1996; Pawelec et al. 1996; Quintarelli et al. 2008). Sie werden dabei als intrazelluläres

Peptid ähnlich den viralen Proteinen durch MHC-Klasse-I präsentiert (Rötschke et al. 1990; Schumacher et al. 1991). Bocchia et al. gelang 1995 erstmalig der Nachweis der Präsentation einer tumorspezifischen Peptidsequenz des BCR/ABL Fusionsproduktes gebunden durch ein Protein der MHC-Klasse-I in einem Versuchsansatz mit humanen Zellen (Bocchia et al. 1995).

Die AML M4eo ist mit der zytogenetischen Abnormität der Inversion 16 (inv16) oder seltener der Translokation 16 (t16;16) assoziiert (Strout et al.1999; Hart et al. 2002). Das Rearrangement der inv(16) bildet das Fusionsprodukt CBF β /MYH11 (Liu et al.1993; Viswanatha et al.1998). Die AML M4eo zeigt unter Therapie gute klinische Ergebnisse und zählt zu der Niedrig-Risiko-Gruppe mit initial hohen Remissionsquoten und einem höheren Anteil an Langzeitremissions-Patienten (Bullinger et al 2004; Heilmeier et al 2007; Lane et al 2008). Unter der Annahme, dass das Fusionsprodukt die Ausbildung eines antigenen Epitopes bewirkt, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob dieser Beobachtung eine immunologische Reaktion der AML Blasten zu Grunde liegen könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass AML Blasten mit nachgewiesener inv(16) im Gegensatz zu AML Blasten anderen Karyotyps zu einer starken Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten im autologen Versuchsansatz führen. Die auf diese Weise aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten induzierten in einem weiteren autologen Versuchsansatz in signifikanter Weise die Apoptose der AML Blasten mit inv(16). Daher postulieren wir für die AML M4eo, dass durch ihr Fusionsprodukt CBF β /MYH11 ein Neoantigen entsteht, das mit Hilfe einer adäquaten Präsentation durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC) eine Immunantwort der zytotoxischen T-Lymphozyten induzieren kann.

Bei vier von vier inv(16) positiven AML Linien blieb das Fusionsprodukt CBF β /MYH11 des malignen Zellklones während der gesamten in vitro Kultivierung mit Hilfe von Westernblot nachweisbar. Das heißt, die AML Blasten kultivierter Linien, die wir für unsere Versuche verwendeten, wiesen immer die mutmaßlich für die Leukogenese verantwortliche Aberration auf. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von anderen wissenschaftlichen Gruppen (Choudhury et al. 1999; Robinson et al. 1996).

Eine weitere Voraussetzung für eine effektive Tumorabwehr ist die adäquate Initiierung einer Immunantwort. AML Blasten verschiedener Unterformen induzieren in

vivo in der Regel nur wenig oder keine T-Lymphozyten-vermittelte-Immunantwort. Spender-Lymphozyten-Infusionen, die Patienten mit einem AML Rezidiv nach allogener Stammzelltransplantation verabreicht wurden, waren teilweise nur wenig erfolgreich (Falkenburg et al. 1997; Schmid et al. 2007).

Viele Studien zur Untersuchung einer Immunantwort induziert durch Tumorzellen sind daran gescheitert, dass durch Blasten als antigenpräsentierende Zellen (APC) auch in vitro trotz ausreichender und adäquater Präsentation von Tumor-assoziierten-Antigenen durch Proteine der MHC-Klasse-I und -II auf AML Blasten keine signifikante Immunantwort der T-Lymphozyten induziert werden konnte. Die alleinige Antigenexpression scheint also nicht ausreichend zu sein, um T-Lymphozyten Immunität zu bewirken. Um eine effektive Immunantwort durch T-Lymphozyten zu erwirken, wird auch die Signalübermittlung über die Bindung von kostimulatorischen Molekülen zwischen antigenpräsentierender Zelle und Lymphozyt benötigt (Ashman et al. 1987; Jenkins et al. 1997; Whiteway et al. 2003).

Zu den wichtigsten kostimulatorischen Signalen gehört die Bindung von CD28 mit den Molekülen CD80 und CD86 aus der B7 Familie. Früheren Studiengruppen gelang es bereits, mit Hilfe von mit B7.1 (CD80) transfizierten Tumorzellen oder mit B7.1 positiver Tumervaccine behandelten dendritischen Zellen eine starke und spezifische T-Lymphozytenstimulation zu induzieren (Lundberg et al. 1993; Hirst et al. 1997; Takahashi et al. 2000).

Die Leukämie Blasten veränderten während der in vitro Kultivierung das Expressionsmuster ihrer Oberflächenantigene wesentlich. Durch Analysen am Durchflusszytometer konnte gezeigt werden, dass AML Blasten unabhängig vom FAB-Typ während einer Kultivierungsphase von vier Wochen die Oberflächenexpression von Vorläufermarkern der myeloischen Zellreihe CD13 und CD33, wie sie für die AML typisch sind, bei gleichbleibender bzw. ansteigender Zellzahl wesentlich verringerten. Dagegen konnten wir ein vermehrtes Expressieren von kostimulatorischen Molekülen aus der B7-Familie (B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86)) und weiteren Adhäsionsmolekülen wie CD11a, CD58 und CD154 feststellen. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass auch Adhäsionsmoleküle einen wichtigen Stellenwert in der suffizienten Antigenerkennung und damit verbundener Initiierung einer Immunantwort haben (Jansen et al. 1992; Bruserud et al. 2000).

Choudhury et al. konnten 1999 zeigen, dass AML Blasten während einer vierzehntägigen Kultivierung unter der Zugabe von Zytokinen wie GM-CSF, IL-4 und

TNF- α eine erhöhte Expression von kostimulatorischen und adhäsiven Molekülen wie CD80, CD86, CD11a und anderen zeigten, und somit das Oberflächenexpressionsmuster ähnlich der einer dendritischen Zelle aufwiesen (Choudhury et al. 1999). Brouwer et al. beschrieben ebenfalls eine erhöhte Expression dieser kostimulatorischen und adhäsiven Moleküle. In ihrer Studie wurden vor allem CD11a und CD58 nach Kultivierung vermehrt exprimiert. Die Expression von CD80 war nach Kultivierung nur leicht erhöht und die von CD86 fiel unter den einzelnen FAB-Typen sehr variabel aus. Sie haben die AML Blasten allerdings nur über 24 Stunden kultiviert (Brouwer et al. 2000).

Vereecque et al. kultivierten die AML Blasten für 48 Stunden ebenfalls unter Zugabe von verschiedenen Zytokinen und anschließender Gamma-Bestrahlung und konnten auf diese Weise, wie auch durch die Zugabe von niedrig dosiertem Cytosin Arabinosid in einer anderen Studie, ähnliche Ergebnisse erzielen. Seine Gruppe berichtete bereits in früheren Studien, dass Gamma-Bestrahlung die Expression von kostimulatorischen Molekülen induzierte (Vereecque et al. 2000 und 2004).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Induktion einer vermehrten Expression der oben beschriebenen Moleküle ohne den Zusatz von Zytokinen oder anderen Substanzen, sowie ohne radioaktive Bestrahlung. CD80 und CD86 wurden nach der Kultivierungsphase gleichermaßen stark exprimiert, ebenso wie weitere kostimulatorische Moleküle.

Choudhury, Brouwer und Vereecque haben die Dynamik der myeloischen Vorläufermarker nicht untersucht. Die hier vorgelegten Daten zeigen, dass unter Kultivierungsbedingungen sich die Oberflächenexpression der Marker CD13 und CD33 verringerte und schließlich nicht mehr nachweisbar war. Der Grund dafür ist nicht klar herzuleiten. Die Expression von CD13 wird bei Kontakt zu einer Stromazelle oder durch Apoptose verringert (Dybkaer et al. 2001). Die Expression von CD33 verliert sich mit zunehmender Reife der Zellen (Simmons et al. 1988). Dies könnte also ein Hinweis sein, dass die Blasten während der Kultivierung eine Art Reifeprozess durchlaufen.

Leukämieblasten könnten also in der Lage sein sich unter Kultivierungsbedingungen zu potenten immunstimulierenden Blasten ähnlich einer dendritischen Zelle zu entwickeln, die an ihrer Oberfläche verstärkt kostimulatorische Peptide exprimieren, die wichtige Signale zur Antigenerkennung und T-Lymphozytenaktivierung übermitteln.

Die Bindung von CD28 an Moleküle der B7-Familie vermittelt außerdem entscheidende Signale zur IL-2 Produktion: Die IL-2-Rezeptoren auf den T-Lymphozyten werden vermehrt exprimiert und führen damit zu einer Zytokinsekretion. Das wiederum fördert die klonale Expansion von T-Lymphozyten und die Differenzierung von T-Lymphozyten zu Effektorzellen (Shahinian et al. 1993, Chan et al. 2005). Die CD28/B7 Bindung hat also nicht nur eine Bedeutung für die initiale T-Lymphozyten Stimulation, sondern spielt somit auch eine wichtige Rolle in der prolongierten Lymphozytenaktivierung (Coyle et al. 2001; Maus et al. 2002). Auch wenn über CD28 bei weitem am meisten bekannt ist, ist der genaue Signalmechanismus noch nicht endgültig aufgeklärt. CD28 hat ebenfalls eine direkte Wirkung auf den T-Zell-Rezeptor (TCR) indem es die Zahl der T-Zell-Rezeptoren reduziert, die durch ein Antigen gebunden werden müssen, um zur Aktivierung des T-Lymphozyten zu führen. Damit erniedrigt CD28 die Reizschwelle der T-Lymphozyten (Itoh et al. 1997; Viola et al. 1996).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass viele AML Zellen zumindest keinen intrinsischen Defekt zu haben scheinen, was die Fähigkeit betrifft, ausreichend kostimulatorische und adhäsive Moleküle präsentieren zu können. Der Signalweg, der für diese Veränderung der Expression der Oberflächenmoleküle im Sinne einer vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen verantwortlich sein könnte, bietet einen Ansatz für weitere Forschungen.

Die zytochemischen Untersuchungen zeigten, dass die Alpha-Naphthylacetatesterase Reaktion bei frisch isolierten und kultivierten Blasten gleichermaßen nachweisbar ist. Vor allem die Blasten AML inv(16) zeigten eine positive Reaktion als starke, diffuse Farbstoffniederschläge – die Reaktion ist die wichtigste zum Nachweis monozytärer Zellen und dient der Subklassifizierung der AML. Die Peroxidase Reaktion (POX) war nach der Kultivierungsphase bei allen AML Zelllinien nur noch schwach nachweisbar. Mit zunehmender Reifegrad der Zellen bzw. Blasten nimmt die Stärke der Reaktion ab (Fuchs et al. 2007). Es stellt sich also erneut die Frage, ob die Blasten während ihrer Kultivierungsphase in der Entwicklung zu einer potentiellen Antigen-präsentierenden-Zelle eine Art Reifungsprozess durchlaufen.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die AML Blasten unabhängig vom FAB-Typ während der Kultivierungsphase sowohl adherent an der Wand der Kulturflasche als auch in Trauben in Medium wachsen. Sie wiesen ähnlich den dendritischen Zellen

kleine Zellfortsätze auf, die ihnen dies zu ermöglichen schienen. Choudhury et al. sowie Santiago-Schwarz et al. machten ähnliche Beobachtungen. Allerdings kultivierten diese die Blasten mit einem Cocktail an Zytokinen (Choudhury et al. 1999, Santiago-Schwarz et al. 1994). Choudhury et al. berichteten außerdem, dass die Blasten ohne die Zugabe von Zytokinen weder proliferierten noch diesen adherenten Zellverband aufwiesen (Choudhury et al. 1999). Die vorgelegten Daten zeigen, dass AML Blasten unter Kultivierung ohne die Zugabe von Zytokinen die Morphologie ähnlich einer dendritischen Zelle mit ausgeprägtem Proliferationsverhalten entwickelten. Nachweislich haben sich während der Kultivierungsphase keine reifen Monozyten oder Dendriten entwickelt, da die klassischen Marker wie CD1a und CD209 oder CD14 nicht exprimiert wurden, folglich können nur AML Blasten als antigenpräsentierende Zellen zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten geführt haben.

3 STIMULATION VON T-LYMPHOZYTEN DURCH KULTIVIERTE AML ZELLEN PHÄNOTYP DER PROLIFERIERENDEN T-LYMPHOZYTEN

Die vergleichenden Analysen der Stimulationsversuche zeigten in den allogenen Versuchsansätzen einen deutlichen Anstieg von CD25 und CD69. Dies lässt auf eine Aktivierung der T-Lymphozyten mit Hochregulation des IL-2 Rezeptors schließen. Nur durch die Blasten der AML inv(16) konnte eine prolongierte Aktivierung aufrechterhalten werden. Im autologen Versuchansatz konnten die T-Lymphozyten ausschließlich durch inv(16) positive AML Blasten aktiviert werden einhergehend mit einer vermehrten Expression der oben genannten Aktivierungsmarker.

Die Stimulationsversuche mit inv(16) positiven AML Blasten liessen in der Expression von CD25 und CD69 eine Dynamik erkennen mit je einem Gipfel an Tag 6 und Tag 11. Folglich ist zu vermuten, dass zwischen den Tagen 7 und 11 eine antigenspezifische Selektion der T-Lymphozyten stattgefunden haben muss: (1) nur eine adäquate Antigenerkennung kann eine T-Lymphozytenaktivierung aufrechterhalten, (2) die repetitive Antigenpräsentation kann nur die das entsprechende Antigen erkennenden T-Lymphozyten einer prolongierten Aktivierung zuführen (Greenfield et al. 1997, Draube et al. 2008, Chatila TA 2008).

Morphologisch konnte vor allem eine enorme Größenzunahme der aktivierten und proliferierenden T-Lymphozyten um bis zu 50% beobachtet werden. Der erstmalige Kontakt mit dem Antigen induziert die primäre Immunantwort, hierbei wandeln sich die aktivierten T-Lymphozyten in die größeren T-Immunoblasten um; gleichzeitig kommt es zur vermehrten Exprimierung von kostimulatorischen Molekülen und

Adhäsionsmolekülen und schließlich bei permanenter Anwesenheit von Antigen zur klonalen Expansion (Moll et al. 2008 S.160).

Die Stimulationsversuche konnten ebenso zeigen, dass Blasten, die kein oder kaum CD80 und/oder CD86 auf ihrer Oberfläche exprimierten, keine Aktivierung der T-Lymphozyten induzieren konnten.

Die aktivierten T-Lymphozyten zeigten ebenfalls eine vermehrte Expression von CD27 auf den aktivierten T-Lymphozyten. Dieses Protein ist ein Mitglied der TNF-Rezeptor Familie. Dieser Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Generierung und Erhaltung von T-Lymphozyten Immunität (Lens et al. 1996).

Die genauere Betrachtung der Subpopulationen der proliferierenden T-Lymphozyten zeigt in Bezug auf das Verhältnis von CD4 Lymphozyten zu CD8 Lymphozyten eine klare Tendenz zu Gunsten von CD8 Lymphozyten. Im Gegensatz zu den Stimulationsversuchen mit anderen AML Blasten zeigte sich in den Stimulationsversuchen mit Beteiligung von AML Blasten mit inv(16) eine deutliche Verlagerung des Verhältnisses von CD4 zu CD8 Lymphozyten von initial 2:1 zu 1:2 bei den aktivierten Lymphozyten. Außerdem zeigt sich in den Stimulationsversuchen mit inv(16) positiven AML Blasten eine signifikante Zunahme der CD25/CD8 doppelt positiven Subpopulation. Es sind also im Wesentlichen die CD8 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten, die aktiviert werden und proliferieren. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass dieser Immunreaktion überwiegend ein über MHC-Klasse-I-Proteine präsentierte tumorassoziiertes Antigen zugrunde liegen könnte, denn nur MHC-Klasse-I Proteine binden und präsentieren zelleigene antigene Peptidfragmente, wie sie für das Fusionsprodukt CBF β /MYH11 postuliert werden.

In den Stimulationsansätzen mit AMLinv(16) proliferierten die CD4+ T-Lymphozyten ebenfalls, wenn auch nur zu einem geringen Prozentsatz. Entscheidend ist, dass die CD4 positiven Helferzellen auch bei der primär zytotoxischen Immunantwort eine große Rolle spielen. Sie sorgen für ein adäquates Zytokinmilieu und das Recrutement weiterer Effektorzellen des Immunsystems (Knutson et al. 2005). Stimulationsversuche mit reinen CD8 positiven T-Lymphozyten waren weniger erfolgreich.

Ebenso war eine kleine CD25/CD4 doppelt positive Subpopulation darstellbar. Sie gehört zu den immunregulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}-Lymphozyten), d.h. sie

übermitteln inhibitorische Signale unter anderem zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen. In unterschiedlichen Tumormodellen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass T_{reg}-Lymphozyten die Funktion und die Proliferation autologer, tumorspezifischer T-Lymphozyten in vitro inhibieren (Ormandy et al. 2005; Wang et al. 2004). So konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CD4+CD25+ Zellen bei Mäusen, denen unterschiedliche Tumorzellen injiziert wurden, zu einem vollständigen Rückgang der Tumoren führte, in den nicht depletierten Kontrollmäusen zeigte sich jedoch ein progredientes Tumorwachstum, das zum Tod der Mäuse führte (Onizuka et al. 1999; Shimizu et al. 1999). Inwieweit der inhibitorische Effekt die vorliegenden Untersuchungen beeinflusst hat, ist unklar, dennoch konnte trotz des Nachweises dieser CD25/CD4 doppelt positiven Subpopulation ein deutlicher zytotoxischer Effekt der CD 8+ T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Weiterhin fiel bei der Phänotypisierung der autolog durch inv(16) positive AML Blasten aktivierten T-Lymphozyten eine CD8/CD45RO doppelt positive Population auf mit einem Gesamtanteil von fast 30% an Tag 11 des Stimulationsversuches. Diese Daten zeigen, dass die Induktion dieser Immunantwort nicht nur zur Bildung von Effektorzellen sondern schließlich auch zur Ausbildung von Gedächtniszellen geführt hat. Bei den eingesetzten peripheren Blutzellen war vor dem Versuchsansatz wenig CD45RO per Durchflusszytometer nachweisbar.

Wissenschaftliche Untersuchungen konnten dabei bisher verschiedene Differenzierungswege zur Gedächtniszelle zeigen: Die aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8+) differenzieren sich zu zytotoxischen Effektorzellen, die sich wiederum nach weiteren Antigenkontakten zu langlebigen CD8 Gedächtniszellen weiterentwickeln können (Jacob et al. 1999; Opferman et al. 1999). Andere Studien zeigten, dass aktivierte CD8+ T-Lymphozyten darauf programmiert sind, sich in Gedächtniszellen zu differenzieren: Diese differenzieren sich nach Antigenkontakt in zytotoxische T-Lymphozyten und entwickeln sich dann ohne weiteren Antigenkontakt zu Gedächtniszellen (Kaeck et al. 2001) oder die Gedächtniszellen differenzieren sich auch unter Umgehung des Stadiums als Effektorzelle direkt in Gedächtniszellen (Lauvau et al. 2001). Aus welchem Differenzierungsweg die Gedächtniszellen in den durchgeführten Stimulationsansätzen entstanden gibt Ansatz für weitere Untersuchungen.

Viruspezifische Gedächtniszellen verweilen für lange Zeit im Körper und können bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen wieder in Effektorzellen differenzieren (Hou et al 1994). Somit wäre der Einsatz von tumorspezifischen Gedächtniszellen ein immuntherapeutischer Ansatz für eine Vaccine im Einsatz zur Bekämpfung von minimal residual disease (Cheuk et al. 2008; Kaech et. al 2002) ähnlich den Erfolgen im Kampf gegen bakterielle und virale Infektionen (Lambert et al. 2005; Robinson et al. 2005). Allerdings sind viele der bisherigen Studienansätze zur Entwicklung von T-Lymphozyten Tumorstimmzellen gescheitert. Zwar konnten die CD8+Gedächtniszellen in vitro generiert und amplifiziert werden, aber ein objektivierbarer klinischer Erfolg nach standardisierten onkologischen Kriterien konnte nur für wenige Tumorerkrankungen nachgewiesen werden (Resitifo et al. 2005; Klebanoff et al 2006). Sallusto et al. konnten zeigen, daß man die CD8 T-Gedächtniszellen in zwei verschiedene Untergruppen unterteilen kann: „Zentrale T-Gedächtniszellen“ (TCM) und „Effektor T-Gedächtniszellen“ (TEM) (Sallusto et al. 1999). Sie unterscheiden sich im Wesentlichen in ihren Migrationseigenschaften und ihrer Teilungsfähigkeit (Lanzavecchia et al. 2005). Die TCM sind dabei effizienter in der Vermittlung protektiver Immunität als die TEM, was unter anderem darauf beruht, dass TCM langlebiger im Organismus überdauern und eine erhöhte Teilungsfähigkeit sowie die Fähigkeit der Generierung weiterer Effektor T- Gedächtniszellen aufweisen (Wherry et al. 2003). Ziel weiterer Forschungen sollte es also sein, das Hauptaugenmerk auf die Generierung und den Einsatz von TCM zu richten. Umansky et al. konnten bereits im Mausmodell zeigen, dass tumorspezifische CD8+ Gedächtniszellen den Tumorprogress in vivo aufhalten können (Umansky et al. 2008).

4 ZYTOTOXIZITÄT

Untersuchungen zur zytolytischen Potenz der zytotoxischen Effektorzellen konnten zeigen, dass nur diejenigen CD8+ Effektorzellen in der Lage waren eine signifikante zytolytische Reaktion zu zeigen, die zuvor im Versuchsansatz mit AML Blasten der M4eo mit inv(16) stimuliert worden waren. Bis zu 50% der Tumorzellen wurden bei einem Verhältnis Effektorzelle zu Tumorzelle von 20: 1 lysiert. Die besten Ergebnisse wurden im autologen Versuchsansatz mit AML Blasten der M4eo erzielt.

Die Generierung spezifischer zytotoxischer CD8+ T-Lymphozyten konnte schon für eine Vielzahl von definierten Peptidsequenzen von Tumorzellen erzielt werden ähnlich der WT1 Gensequenz bei der AML oder den MAA Gensequenzen beim malignen Melanom (Ohnishi et al. 2000; Nolte et al. 2003; Greiner et al. 2006). Bei

den meisten Studienansätzen erfolgte allerdings die Aktivierung der T-Lymphozyten durch mit Peptid beladene dendritische Zellen. Im Fall der AML inv(16) ist die tumorassoziierte, potentiell antigene Gensequenz noch nicht identifiziert. Die T-Lymphozyten wurden in unseren Untersuchungen allein durch ein potentiell antigenes Peptid, das durch die Tumorzelle selbst in ausreichendem Maße präsentiert wurde, aktiviert. In einem weiteren Schritt konnten wir dann mit Hilfe der Zytotoxizitätsversuche zeigen, dass diese Aktivierung der T-Lymphozyten durch die AML Blasten mit inv(16) peptidspezifisch sein muß, da im autologen Versuchsansatz eine signifikante Zytolyse der Blasten nachzuweisen war.

Durch das Blockieren sowohl des MHC-Klasse-I Rezeptors als auch des CD8-Rezeptors durch die Vorbehandlung mit entsprechenden Antikörpern, konnte die zytolytische Reaktion durch die Effektorzellen gehemmt werden. Eine Blockierung des MHC-Klasse-II Rezeptors oder des CD4-Rezeptors konnte die Zytolyse nicht hemmen. Das Ergebnis des Blockversuches bestätigt somit die entscheidende Rolle der CD8-MHC-Klasse I-Interaktion zur Ausbildung einer spezifischen zytolytischen Reaktion (Germain et al. 1993; Yewdell et al. 2002; Savage et al. 2007; Campbell et al. 2008)

Dies sind weitere Hinweise dafür, dass es durch das Fusionsprotein CBF β -MYH11 zur Ausbildung von Peptidsequenzen im Sinne eines Neoantigens mit potentiell immunogener Wirkung kommt.

Die Effektorzellen zeigten eine potente Zytotoxizität gegen die autologen leukämischen Blasten mit inv(16). So ist es vorstellbar, dass auf diese Weise induzierte Zellen eventuell einen Platz im klinischen Gebrauch finden könnten. In vitro generierte zytotoxische antigenspezifische T-Lymphozyten wären ein guter Ansatz zur Wiederherstellung oder Verbesserung einer bereits bestandenen antitumoralen Immunität. Ebenfalls wären sie als begleitende Immuntherapie/Adjuvanz zur konventionellen Chemotherapie eine potenzielle und praktikable Möglichkeit zur Behandlung der Leukämie, besonders im Stadium eines minimal residual disease (Slavin et al. 1996; Greiner et al. 2006 (Haematologica)). Die schweren Nebenwirkungen einer Graft-versus-Host-Disease wie nach Donor Lymphocyte-Infusion wären nach einer Infusion mit autologen antigenspezifischen Lymphozyten nicht zu erwarten (Lamb et al. 2001).

VII Zusammenfassung

Patienten mit einer AML M4eo mit Inversion des Chromosoms 16 (inv16) zeigen unter Therapie gute klinische Ergebnisse. Ziel war es herauszufinden, ob dem eine besondere Immunogenität der Blasten zugrunde liegen könnte.

Die AML M4eo inv(16) ist mit der Mutation des Transskriptionsfaktors Core binding factor und dem daraus resultierenden Fusionsprodukt CBF β /MYH11 assoziiert.

Durch Westernblot konnten in 4 von 4 inv(16) positiven AML Blasten das Fusionsprodukt CBF β /MYH11 nachgewiesen werden. Dieses könnte die molekulare Basis für das Präsentieren von Leukämie-spezifischen Peptiden bilden. Das Protein, das mutmaßlich für die Leukogenese verantwortlich ist, blieb in vitro während der gesamten Kultivierungsphase der AML Zelllinien nachweisbar.

Das Präsentieren von solchen spezifischen Peptidsequenzen alleine reicht jedoch nicht aus, um eine effiziente Lymphozyten Aktivierung zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass Leukämie Blasten verschiedener Karyotypen nach vier Wochen unter Kultivierungsbedingungen das Expressionsmuster ihrer Oberflächenmarker veränderten. Vorläufermarker wie CD13, CD33 und CD34 wurden vermindert exprimiert, kostimulatorische Marker wie CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD11a und CD58 vermehrt exprimiert. Typische Dendritenmarker wie CD1a und CD209 wurden nicht exprimiert, somit konnte die Ausbildung von dendritischen Zellen unter in vitro Kultivierung ausgeschlossen werden.

Allogene sowie autologe T-Lymphozyten konnten durch kultivierte Blasten der AML inv(16) aktiviert werden, gefolgt von einer signifikanten Proliferation mit der Expression von typischen Aktivierungsmarkern wie CD25 und CD69. Ein hoher Anteil dieser aktivierten T-Lymphozyten erwiesen sich als CD8 positiv. Durch AML Blasten anderen Karyotyps hingegen konnten autologe T-Lymphozyten nicht zu einer signifikanten Immunantwort aktiviert werden, obwohl auch sie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimierten. Das lässt den Schluss zu, dass das aus der inv(16) resultierende Fusionsprodukt CBF β /MYH11 zur Ausbildung eines tumorassoziierten Antigens führt.

Die durch inv(16) positiven Blasten aktivierte T-Lymphozyten konnten oligoklonal expandiert werden und waren in der Lage inv(16) positive AML Blasten MHC-Klasse-I restringiert zu einem deutlichen Prozentsatz zu lysieren.

AML Blasten mit nachgewiesener inv(16) sind also in der Lage, sich in immunogene Zellen mit signifikanter Stimulationskapazität zu differenzieren. Aus den Ergebnissen

der vorliegenden Arbeit kann der Schluss gezogen werden, dass die AML inv(16) eine besondere Stellung in der Bewertung ihrer Immunogenität einnimmt.

VIII Summary

Patients with acute myeloid leukemia M4eo with inversion of chromosome 16 show good clinical results under therapy. Our aim was it to find out whether a special immunogenecity of the blasts could be based upon this.

AML M4eo is associated with mutations in the transcription factor core binding factor (CBF) region resulting in the fused protein CBF β /MYH11 (myosin heavy polypeptide). In four of four inv (16) positive AML blasts we identified the fused protein CBF β /MYH11 by westernblot analysis. The expression of fused or mutated proteins such as CBF β /MYH11 could be a molecular basis for the expression of leukemia specific peptide sequences. This protein, which is presumed to be responsible for leukemogenesis remained detectable during the in vitro cultivation phase of the AML lines.

The presentation of such specific antigenic peptide sequences alone does not seem to be sufficient enough to induce an efficient T cell activation. These data show that AML blasts of various caroytypes had a significant shift in the expression pattern profile during a culture period of four weeks. We observed loss of expression of progenitor markers as CD13, CD33 and CD34, whereas we detected an increased expression of costimulatory markers as CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD11a and CD58. Expression of dendritic markers as CD1a and CD209 were not detected, so the development of dendritic cells during the culture period could be excluded.

Allogene as well as autologe T cells could be stimulated through AML blasts with inv(16) followed by an significant proliferation with an increased expression of typical activation markers such as CD25 and CD69. Analysis of the expanded T cells showed that the proliferating T cells were predominatly CD8+ phenotype. AML blasts with other karyotypes than inv(16) activated T cells, but without inducing such a significant proliferation, although these blasts showed the expression of costimulatory molecules. As a consequence it can be concluded, that the fused protein CBF β /MYH11 originating from inv(16) results in the development of antigenic leukemia specific peptide sequences.

The oligoclonal expanded activated T cells were able to lyse inv(16) positive AML blasts in a specific major histocompatibilty complex class I restricted manner, blocking experiments were carried out.

These data show that AML blasts with inv(16) could differentiate in immunogene cells with significant stimulating capacity. The conclusion from this study is, that AML inv(16) plays a special role referring to immunogenicity

IX **Literaturverzeichnis**

Abbas AK

Cellular and Molecular Immunology (engl.).
W.B. Saunders Company, 2005 (5th Update)

Abrams SI

Positive and negative consequences of Fas/Fas ligand interactions in the antitumor response.
Frontiers in Bioscience 2005 Jan; 10:809-21

Apasov S, Redegeld F, Sitko

Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors.
Current Opinion in Immunology 1993 Jun; 5:404-10

Ashman LK, Kriek GW, Cooper SJ, O'Keefe DE.

Requirements for the stimulation of allogeneic T lymphocytes by acute non-lymphoblastic leukaemia cells.
Cancer Immunology Immunotherapy 1987; 25:250-6

Au WY, Lie AK, Lee CK, Liang R, Kwong YL

Donor lymphocyte infusion induced molecular remission in relapse of acute myeloid leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation.
Bone Marrow Transplantation 1999 Jun; 23:1201-3

Bloomfield CD, Goldman A, Hassfeld D, de la Chapelle A

Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia.
Cancer Genetics and Cytogenetics 1984 Mar; 11:332-50

Bocchia M, Wentworth PA, Southwood S, Sidney J, McGraw K, Scheinberg DA, Sette A.

Specific binding of leukemia oncogene fusion protein peptides to HLA class I molecules.
Blood 1995 May; 85:2680-4

Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B

Tumor antigens recognized by T cells.
Immunology Today 1997 Jun; 18:267-8

Brouwer RE, Zwinderman KH, Kluin-Nelemans HC, van Luxemburg-Heijs SA, Willemze R, Falkenburg JH.

Expression and induction of costimulatory and adhesion molecules on acute myeloid leukemic cells: implications for adoptive immunotherapy.
Experimental Hematology 2000 Feb; 28:161-8

Bruserud O

Acute myelogenous leukemia blasts as accessory cells during T lymphocyte activation: possible implications for future therapeutic strategies.
Leukemia 1999 Aug; 13:1175-87

Bruserud O, Ulvestad E.

Acute myelogenous leukemia blasts as accessory cells during in vitro T lymphocyte activation.

Cellular Immunology 2000 Nov; 25:36-50

Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Döhner H, Pollack JR.

Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia.

New England Journal of Medicine 2004 Apr; 15:1605-16

Burmester G-R, Pezzutto A

Taschenatlas der Immunologie, Grundlagen, Labor, Klinik

Thieme Verlag, Stuttgart 2006 2. Auflage

Burnett AK, Eden OB.

The treatment of acute leukaemia.

Lancet 1997 Jan; 25:270-5

Campbell PD, Estella E, Dudek NL, Jhala G, Thomas HE, Kay TW, Mannering SI.

Cytotoxic T-lymphocyte-mediated killing of human pancreatic islet cells in vitro.

Human Immunology 2008 Sep; 69:543-51

Cantrell DA

T cell antigen receptor signal transduction pathways.

Cancer Surveys 1996; 27:165-75

Chan L, Hardwick N, Darling D, Galea-Lauri J, Gäken J, Devereux S, Kemeny M, Mufti G, Farzaneh F.

IL-2/B7.1 (CD80) fusogene transduction of AML blasts by a self-inactivating lentiviral vector stimulates T cell responses in vitro: a strategy to generate whole cell vaccines for AML.

Molecular Therapy 2005 Jan; 11:120-31

Chatila TA

Molecular mechanisms of regulatory T-cell development.

Chemical Immunology and Allergy. 2008; 94:16-28

Cheuk AT, Guinn BA.

Immunotherapy of acute myeloid leukaemia: development of a whole cell vaccine.

Frontiers in Bioscience 2008 Jan;13:2022-9

Choudhury BA, Liang JC, Thomas EK, Flores-Romo L, Xie QS, Agusala K, Sutaria S, Sinha I, Champlin RE, Claxton DF.

Dendritic cells derived in vitro from acute myelogenous leukemia cells stimulate autologous, antileukemic T-cell responses.

Blood 1999 Feb; 93:780-6

- Clark** RE, Dodi IA, Hill SC, Lill JR, Aubert G, Macintyre AR, Rojas J, Bourdon A, Bonner PL, Wang L, Christmas SE, Travers PJ, Creaser CS, Rees RC, Madrigal JA
Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein.
Blood 2001 Nov; 98:2887-93
- Cole** N, Gibson BE.
High-dose cytosine arabinoside in the treatment of acute myeloid leukaemia.
Blood Reviews 1997 Mar; 11:39-45
- Cortes** JE, Kantarjian HM, O'Brien S, Giles F, Keating MJ, Freireich EJ, Estey EH
A pilot study of interleukin-2 for adult patients with acute myelogenous leukemia in first complete remission.
Cancer 1999 Apr; 85:1506-13
- Coyle** AJ, Gutierrez-Ramos JC
The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function.
Nature Immunology 2001 Mar; 2:203-9
- De Plaen** E, Lurquin C, Lethé B, van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, Coulie P, Van Pel A, Boon T
Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes.
Methods 1997 Jun; 12:125-42
- Draube** A, Beyer M, Wolf J
Activation of autologous leukemia-specific T cells in acute myeloid leukemia: monocyte-derived dendritic cells cocultured with leukemic blasts compared with leukemia-derived dendritic cells.
European Journal of Haematology 2008 Oct; 81:281-8
- Dybkaer** K, Olesen G, Pedersen FS, Kristensen JS.
Stromal-mediated down-regulation of CD13 in bone marrow cells originating from acute myeloid leukemia patients.
European Journal of Haematology 2001 Mar; 66:168-77
- Enk** AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J
Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma.
International Journal of Cancer 1997 Nov; 73:309-16
- Falk** K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG.
Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules.
Nature 1991 May; 23:290-6
- Falkenburg** JH, Smit WM, Willemze R
Cytotoxic T-lymphocyte (CTL) responses against acute or chronic myeloid leukemia.
Immunological Reviews 1997 Jun; 157:223-30

- Fuchs R**, Herwartz R, Guggenberger D, Maassen S, Schäfer S, Schlegel F, Tajrobehkar K, Wehle-Ilka S, Winzenried S, Nebe T (Mannheim), Thomaööa J (Koblenz)
Manual Hämatologie, Nora Verlag GmbH, Stolberg 2007
- Gambacorti-Passerini C**, Grignani F, Arienti F, Pandolfi PP, Pelicci PG, Parmiani G.
Human CD4 lymphocytes specifically recognize a peptide representing the fusion region of the hybrid protein pml/RAR alpha present in acute promyelocytic leukemia cells.
Blood 1993 Mar; 81:1369-75
- Garcia-Lora A**, Algarra I, Garrido F
MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape.
Journal of Cellular Physiology 2003 Jun; 195:346-55
- Garrido F**, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL
Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours.
Immunology Today. 1997 Feb; 18:89-95
- Geary SM**, Ashman LK
HL-60 myeloid leukaemia cells acquire immunostimulatory capability upon treatment with retinoic acid: analysis of the responding population and mechanism of cytotoxic lymphocyte activation.
Immunology 1996 Jul; 88:428-40
- Germain RN**, Margulies DH
The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation.
Annual Review of Immunology 1993; 11:403-50
- Goldstein MD**, Watts TH
Identification of distinct domains in CD40 involved in B7-1 induction or growth inhibition.
Journal of Immunology 1996 Oct; 157: 2837-43
- Greenfield EA**, Nguyen KA, Kuchroo VK
CD28/B7 costimulation: a review.
Critical Reviews in Immunology 1998; 18:389-418
- Greiner J**, Bullinger L, Guinn BA, Döhner H, Schmitt M
Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells.
Clinical Cancer Research 2008 Nov; 14:7161-6
- Greiner J**, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A, Dohner K, Schlenk RF, Pollack JR, Dohner H, Bullinger L
Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches.
Blood 2006 Dec; 108:4109-17

Greiner J, Döhner H, Schmitt M

Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens.

Haematologica 2006 Dec; 91:1653-61

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A

The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties.

Blood 1998 Oct; 92:2322-33

Hart SM, Foroni L

Core binding factor genes and human leukemia.

Haematologica 2002 Dec; 87:1307-23

Healy F, Drouet C, Romero P, Jaulin C, Maryanski JL.

Conversion of a self peptide sequence into a Kd-restricted neo-antigen by a Tyr substitution.

The Journal of Experimental Medicine 1991 Dec; 174:1657-60

Hehlmann R, Berger U, Aul C, Büchner T, Döhner H, Ehninger G, Ganzer A, Gökbuget N, Hoelzer D, Uberla K, Gassmann W, Ludwig WD, Rieder H, Kneba M, Hochhaus A, Reiter A, Hiddemann W, Ottmann OG, Germing U, Adelhard K, Dugas M, Dirschedl P, Messerer D, Böhme A, Harrison-Neu E, Griesshammer M, Kienast J, Kolb HJ, Ho AD, Hallek M, Neubauer A, Schlegelberger B, Niederwieser D, Heil G, Müller T, Hasford J

The German competence network 'Acute and chronic leukemias'.

Leukemia 2004 Apr; 18:665-9

Heilmeier B, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J

Diagnostics, classification and prognostic criteria of acute myeloid leukemia

Medizinische Klinik (Munich) 2007 Apr; 102:296-308

Herold G und Mitarbeiter

Innere Medizin

Herausgeber: Gerd Herold, Köln, 2003

Hirst WJ, Buggins A, Darling D, Gäken J, Farzaneh F, Mufti GJ

Enhanced immune costimulatory activity of primary acute myeloid leukaemia blasts after retrovirus-mediated gene transfer of B7.1.

Gene Therapy 1997 Jul; 4:691-9

Hogg N, Landis RC

Adhesion molecules in cell interactions.

Current Opinion in Immunology 1993 Jun; 5:383-90

- Horn F**, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Berghold S, Schneider N, Münster B
 Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium
 Thieme, Stuttgart, 2005 (3. Auflage)
- Hou S**, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC
 Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size.
 Nature 1994 Jun;369:652-4
- Itoh Y**, Germain RN.
 Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells.
 The Journal of Experimental Medicine 1997 Aug; 186:757-66
- Jacob J**, Baltimore D
 Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo.
 Nature 1999 Jun; 399:593-7
- Jäger E**, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jäger D, Oesch F, Knuth
 Immunoselection in vivo: independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma.
 International Journal of Cancer 1997 Apr; 71:142-7
- Janeway CA**
 Immunologie
 Spektrum Akademischer Verlag, 2002 (5. Auflage)
- Jansen JH**, van der Harst D, Wientjens GJ, Kooy-Winkelaar YM, Brand A, Willemze R, Kluin-Nelemans HC
 Induction of CD11a/leukocyte function antigen-1 and CD54/intercellular adhesion molecule-1 on hairy cell leukemia cells is accompanied by enhanced susceptibility to T-cell but not lymphokine-activated killer-cell cytotoxicity.
 Blood 1992 Jul; 80:478-83
- Jenkins MK**, Taylor PS, Norton SD, Urdahl KB
 CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells.
 Journal of Immunology 1991 Oct; 147:2461-6
- Kaech SM**, Ahmed R.
 Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells.
 Nature Immunology 2001 May; 2:415-22
- Kaech SM**, Wherry EJ, Ahmed R
 Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development.
 Nature Reviews Immunology 2002 Apr; 2:251-62
- King ME**, Rowe JM
 Recent developments in acute myelogenous leukemia therapy.
 The Oncologist 2007; 12:14-21

Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP

CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy.

Immunological Reviews 2006 Jun; 211:214-24

Knuth A, Danowski B, Oettgen HF, Old LJ

T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1984 Jun; 81:3511-5

Knutson KL, Disis ML

Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy.

Cancer Immunology, Immunotherapy 2005 Aug; 54:721-8

Kundu M, Liu PP

Function of the inv(16) fusion gene CBFB-MYH11.

Current Opinion of Hematology 2001 Jul; 8:201-5

Lamb LS Jr, Musk P, Ye Z, van Rhee F, Geier S, Tong J, King KM, Henslee-Downey P

Human gammadelta(+) T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response.

Bone Marrow Transplantation 2001 Mar; 27:601-6

Lambert PH, Liu M, Siegrist CA

Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses?

Nature Medicine 2005 Apr; 11:54-62

Lane S, Saal R, Mollee P, Jones M, Grigg A, Taylor K, Seymour J, Kennedy G, Williams B, Grimmett K, Griffiths V, Gill D, Hourigan M, Marlton P

A ≥ 1 log rise in RQ-PCR transcript levels defines molecular relapse in core binding factor acute myeloid leukemia and predicts subsequent morphologic relapse.

Leukemia & Lymphoma 2008 Mar; 49:517-23

Lanier LL

Natural killer cell receptors and MHC class I interactions.

Current Opinion of Immunology 1997 Feb; 9:126-31

Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, Ito D, Azuma M

CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL.

Journal of Immunology 1995 Jan; 154:97-105

Lanzavecchia A, Sallusto F.

Understanding the generation and function of memory T cell subsets.

Current Opinion of Immunology 2005 Jun; 17:326-32

Lauvau G, Vijn S, Kong P, Horng T, Kerkisiek K, Serbina N, Tuma RA, Pamer EG

Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine.

Science 2001 Nov; 294:1735-9

- Lens SM**, de Jong R, Hintzen RQ, et al.
CD27-CD70 Interaktion: Aufdeckung seiner Verwicklung in normalen und neoplastischen B-Zell-Wachstum.
Leukemia & Lymphoma 1996; 18: 51-9
- Liu P**, Tarlé SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS
Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia.
Science 1993 Aug; 261:1041-4
- Lundberg A**, Gribben S, Lazo S, Nadler LM
Expression and induction of B7 on leukemic cells isolated from patients with haematologic malignancies.
Blood 1993; 82:123a
- Maeurer MJ**, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze MT
Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen.
The Journal of Clinical Investigation 1996 Oct; 98:1633-41
- Maffei A**, Harris P
Peptides bound to major histocompatibility complex molecules.
Peptides 1998; 19:179-98
- Matsuda M**, Petersson M, Lenkei R, Taupin JL, Magnusson I, Mellstedt H, Anderson P, Kiessling R.
Alterations in the signal-transducing molecules of T cells and NK cells in colorectal tumor-infiltrating, gut mucosal and peripheral lymphocytes: correlation with the stage of the disease.
International Journal of Cancer 1995 Jun; 61:765-72
- Maus MV**, Thomas AK, Leonard DG, Allman D, Addya K, Schlienger K, Riley JL, June CH.
Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB.
Nature Biotechnology 2002 Feb; 20:143-8
- Mitani K**
Molecular mechanisms in leukemogenesis
Gan To Kagaku Ryoho. Cancer & Chemotherapy 2002 Jul; 29:1107-12
- Mitrou P S**, Länger F
Atlas der Hämatologie und hämatologischen Onkologie
Herausgeber: Mitrou & Länger GbR, Frankfurt, 2001
- Moll KJ**, Moll M
Anatomie
Elsevier Urban & Fischer 2006

Mrózek K

Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype.

Seminars in Oncology 2008 Aug; 35:365-77

Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD

Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia.

Best Practice & Research. Clinical Haematology 2001 Mar; 14:19-47

Noite A, Scheffold C, Slotty J, Huenefeld C, Schultze JL, Grabbe S, Berdel WE, Kienast J.

Generation of melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes for allogeneic immunotherapy.

Journal of Immunotherapy 2003 May-Jun; 26:257-69

Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S.

HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8+ cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide.

Blood 2000; 95: 286-93

Old L, Boyse EA, Lilly F

Formation of cytotoxic antibody against leukemias induced by Friend virus

Cancer Research 1963 Aug; 23:1063-8

Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T and Nakayama E

Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody

Cancer Research 1999; 59:3128-33

Opferman JT, Ober BT, Ashton-Rickardt PG

Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes.

Science 1999 Mar; 283:1745-8

Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF and Korangy F

Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma

Cancer Research 2005; 65: 2457-64

Pawelec G, Max H, Halder T, Bruserud O, Merl A, da Silva P, Kalbacher H

BCR/ABL leukemia oncogene fusion peptides selectively bind to certain HLA-DR alleles and can be recognized by T cells found at low frequency in the repertoire of normal donors.

Blood 1996 Sep; 88:2118-24

Quintarelli C, Dotti G, De Angelis B, Hoyos V, Mims M, Luciano L, Heslop HE, Rooney CM, Pane F, Savoldo B

Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia.

Blood 2008 Sep; 112:1876-85

- Reichert TE**, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, Whiteside TL
 Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma.
 Clinical Cancer Research 2002 Oct; 8:3137-45
- Renz-Polster H**, Braun J
 Basislehrbuch Innere Medizin
 Urban & Fischer Verlag Munchen-Jena, 2000
- Restifo NP**, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mulé JJ, Rosenberg SA, Bennink JR
 Identification of human cancers deficient in antigen processing.
 The Journal of Experimental Medicine 1993 Feb; 177:265-72
- Restifo NP**, Rosenberg SA.
 Use of standard criteria for assessment of cancer vaccines.
 The Lancet Oncology 2005 Jan; 6:3-4
- Ringdén O**, Le Blanc K
 Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives.
 Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica 2005; 113:813-30
- Robinson HL**, Amara RR
 T cell vaccines for microbial infections.
 Nature Medicine 2005 Apr; 11:25-32
- Robinson SP**, Kearney L, Jalo RJ, Knight SC, Reid CDL, Samson D
 Proof of malignant clone of origin of dendritic cells growing in culture from a patient with del(5)(q13q33) acute mixed lineage leukemia.
 Blood 1996; 88:160
- Rötzschke O**, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee HG.
 Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells.
 Nature 1990 Nov; 348:252-4
- Sahin FI**, Kizilkilic E, Bulakbasi T, Yilmaz Z, Boga C, Ozalp O, Karakus S, Ozdogu H
 Cytogenetic findings and clinical outcomes of adult acute myeloid leukaemia patients.
 Clinical and Experimental Medicine 2007 Sep; 7:102-7
- Sahin U**, Türeci Ö, Pfreundschuh M
 Vom Immunsystem erkennbare Antigene auf menschlichen Malignomen
 Der Onkologe 1999; 5:659-67
- Sallusto F**, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A.
 Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.
 Nature 1999 Oct; 401:708-12

Santiago-Schwarz F, Coppock DL, Hindenburg AA, Kern J

Identification of a malignant counterpart of the monocyte-dendritic cell progenitor in an acute myeloid leukemia.

Blood 1994 Nov; 84:3054-62

Savage P, Millrain M, Dimakou S, Stebbing J, Dyson J

Expansion of CD8+ cytotoxic T cells in vitro and in vivo using MHC class I tetramers.

Tumour Biology 2007; 28:70-6

Schmid C, Labopin M, Nagler A, Bornhäuser M, Finke J, Fassas A, Volin L, Gürkman G, Maertens J, Bordignon P, Holler E, Ehninger G, Polge E, Gorin NC, Kolb HJ, Rocha V; EBMT Acute Leukemia Working Party

Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party.

Journal of Clinical Oncology 2007 Nov; 25:4938-45

Schumacher TN, De Bruijn ML, Vernie LN, Kast WM, Melief CJ, Neefjes JJ, Ploegh HL.

Peptide selection by MHC class I molecules.

Nature 1991 Apr; 350:703-6

Schwarz EC, Kummerow C, Wenning AS, Wagner K, Sappok A, Waggershäuser K, Griesemer D, Strauss B, Wolfs MJ, Quintana A, Hoth M.

Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation.

European Journal of Immunology 2007 Oct; 37:2723-33

Seliger B, Dunn T, Schwenzer A, Casper J, Huber C, Schmoll HJ.

Analysis of the MHC class I antigen presentation machinery in human embryonal carcinomas: evidence for deficiencies in TAP, LMP and MHC class I expression and their upregulation by IFN-gamma.

Scandinavian Journal of Immunology 1997 Dec; 46:625-32

Seliger B, Huber C

"Immun escape"-Mechanismen von humanen Tumoren

Der Onkologe 1999; 5:668-78

Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kündig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW

Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice.

Science 1993 Jul; 261:609-12

Shigesada K, van de Sluis B, Liu PP

Mechanism of leukemogenesis by the inv(16) chimeric gene CBFB/PEBP2B-MHY11.

Oncogene 2004 May; 23:4297-307

Shimizu J, Yamazaki S and Sakaguchi S

Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity

Journal of Immunology 1999; 163: 5211-18

Simmons D, Seed B.

Isolation of a cDNA encoding CD33, a differentiation antigen of myeloid progenitor cells.

Journal of Immunology 1988; 141:2797-2800

Slavin S, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, Brautbar C, Orr R
Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation.

Blood 1996 Mar; 87:2195-204.

Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G, Schuler G, Knop J, Enk AH

Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells.

Blood 1999 Mar; 93:1634-42

Strout MP, Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD

Core-binding factor (CBF) and MLL-associated primary acute myeloid leukemia: biology and clinical implications.

Annals of Hematology 1999 Jun; 78:251-64

Takahashi T, Hirano N, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Hirai H.

Immunogene therapy against mouse leukemia using B7 molecules.

Cancer Gene Therapy 2000 Jan; 7:144-50

Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM

Drug therapy for acute myeloid leukemia.

Blood 2005 Aug; 106:1154-63

Umansky V, Abschuetz O, Osen W, Ramacher M, Zhao F, Kato M, Schadendorf D.

Melanoma-specific memory T cells are functionally active in Ret transgenic mice without macroscopic tumors.

Cancer Research 2008 Nov; 68:9451-8

Van der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T

Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells.

Immunological Reviews 2002 Oct; 188:51-64

Verecque R, Buffenoir G, Gonzalez R, Cambier N, Hetuin D, Bauters F, Fenaux P, Quesnel B.

Gamma-ray irradiation induces B7.1 expression in myeloid leukaemic cells.

British Journal of Haematology 2000 Mar; 108:825-31

Verecque R, Saudemont A, Depil S, Corm S, Andrieux J, Soenen-Cornu V, Quesnel B.

Efficient generation of antileukemic autologous T cells by short-term culture and

gamma-irradiation of myeloid leukemic cells.

Cancer Immunology, Immunotherapy 2004 Sep; 53:793-8

Vereecque R, Saudemont A, Quesnel B.

Cytosine arabinoside induces costimulatory molecule expression in acute myeloid leukemia cells.

Leukemia 2004 Jul; 18:1223-30

Viola A, Lanzavecchia A

T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds.

Science 1996 Jul; 273:104-6

Viswanatha DS, Chen I, Liu PP, Slovak ML, Rankin C, Head DR, Willman CL

Characterization and use of an antibody detecting the CBFbeta-SMMHC fusion protein in inv(16)/t(16;16)-associated acute myeloid leukemias.

Blood 1998 Mar; 91:1882-90

Walker PR, SAAS P, Dietrich PY

Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back.

Journal of Immunology 1997 May; 158:4521-4

Wang HY, Lee DA, Peng G, Guo Z, Li Y, Kiniwa Y, Shevach EM and Wang RF

Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy

Immunity 2004; 20:107-118

Wherry EJ, Teichgräber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, von Andrian UH, Ahmed R

Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets.

Nature Immunology 2003 Mar; 4:225-34

Whiteway A, Corbett T, Anderson R, Macdonald I, Prentice HG

Expression of co-stimulatory molecules on acute myeloid leukaemia blasts may effect duration of first remission.

British Journal of Haematology 2003 Feb; 120:442-51

Yewdell JW, Hill AB

Viral interference with antigen presentation.

Nature Immunology 2002 Nov; 3:1019-25

Yin JA, Tobal K

Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: methodologies, clinical and biological significance.

British Journal of Haematology 1999 Sep; 106:578-90

Zheng P, Liu Y

Costimulation by B7 modulates specificity of cytotoxic T lymphocytes: a missing link that explains some bystander T cell activation.

Journal of Experimental Medicine 1997 Nov; 186:1787-91

X Anhang

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigen presenting cell
APL	Akute Promyelozyten Leukämie
ARA-C	Cytosin Arabinosid
AUL	Akute undifferenzierte Leukämie
Baso	Basophilie
BSA	Bovines Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CBF	Core binding factor
CD	cluster of differentiation
CO ₂	Kohlendioxid
Cs	Cesium
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
DC	Dendritic cells
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
d.h.	das heisst
DLI	Donor-Lymphocyte-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonucleinacid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	Elektrochemilumineszenz
E. coli	Escherichia coli
EBV-LCL	Eppstein-Barr-virus-transformed-B-lymphoblastoid-cell-lines
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FAB	French-American-British-Group
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FS	Forward scatter
GF	Growth factor
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GvHD	Graft-versus-Host-disease
Gy	Gray
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Inv	Inversion chromosomaler Sequenzen
KM	Knochenmark
L.	Leukämie
LAK	Lymphokin-aktivierter-Killer
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LFA	Lymphozyten-Funktions-Antigen
LPS	Lipopolysaccharid
m	Männlich
MAA	Melanom-assoziiertes Antigen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	major histocompatibility complex
MLR	Mixed lymphocyte reaction
MTuLR	Mixed tumor lymphocyte reaction
Max	maximal
N-CAM	neuronales Zelladhäsionsmolekül
NK	natural killer
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacryl-Elektrophorese
PAS	p-Aminosalicylsäure
PB	peripheres Blut
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCR	Polymerasechainreaction
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd

PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidium-Iodide
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rez	Rezeptor
RIPA	Radioimmunopräzipitations Assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
S.	Seite
SC	standard cells
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERCA	Sarcoplasmatic/Endoplasmatic Reticulum Calcium ATPase
SRBC	sheep red blood cell
SS	Side scatter
T	Translokation von Chromosomenabschnitten
t_0	zum Zeitpunkt 0
t_x	zum Zeitpunkt x
Tab.	Tabelle
TCM	Zentrale-T-Gedächtniszelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
$^3\text{H-Tdr.}$	Thymidin
TEM	Effektor-T-Gedächtniszelle
T_H	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
w	Weiblich
WHO	World Health Organization
WT1	Wilms-Tumorsuppressorgen
z. B.	zum Beispiel

2 DIMENSIONEN

cm	Centimeter
g	Gramm oder Erdbeschleunigung ($g=9,81 \text{ m/s}^2$)
Gy	Gray
l	Liter
IE	Internationale Einheiten
kDa	kiloDalton
min	Minuten
nm	Nanometer
μCi	Mikro-Curie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
rd	Rad (radiation absorbed dose)
S	Sekunde
U	Units
V	Volt
%	Prozent

XI Ethische Grundlagen und Datenschutz

Patienten, bei denen die Diagnose akute myeloische Leukämie nach den Kriterien der French- American- British Klassifikation gestellt wurde, kamen für diese Studie in Frage, insbesondere Patienten mit einer AML M4eo. Die Probendenauswahl bezog sich also auf die zu bearbeitende Leukämieform. Die Blut-und Knochenmarksproben wurden im Verlauf der therapiebedingten Kontrollen entnommen – es kam also nicht zu einer zusätzlichen Materialentnahme an den Patienten. Weitere Risiken entfielen für die Patienten, da es aufgrund der Studie nicht zu zusätzlichen Experimenten am Menschen kam. Ebenfalls wurden keine gentechnologischen Experimente an humanem Material durchgeführt.

Die Probandenaufklärung ist Teil der Studie. Die Patientendaten unterliegen dem Datenschutz.

XII Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Frankfurt, im Januar 2010

Kerstin Ihlow

XIII Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. med. G.-A. Banat für das zur Verfügung gestellte herausfordernde Thema sowie für die konstante und engagierte Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Marianne Hoeck für die Einführung in die Laborarbeit sowie ihre kompetente und unermüdliche Hilfe bei den Zellkulturen sowie Westernblot und PCR.

Ebenfalls danke ich den Mitarbeitern der Station der Hämatologie/Onkologie, onkologischen Tagesklinik und der Blutbank für die freundliche Unterstützung.

Allen Mitarbeitern des Hämatologielabors danke ich für das gute Arbeitsklima sowie den hilfreichen und regen Austausch, insbesondere Frau Sabine Tschischka für die vielen gemeinsam verbrachten Arbeitsstunden.